

Institut für Medizinische Virologie der Charité zu Berlin

Dissertation

Die Rolle des Proteasoms für die Replikation des Humanen Cytomegalievirus

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Marion Kaspari

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. rer. nat. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. PD Dr. Elke Bogner

2. Prof. Dr. Detlev H. Krüger

3. Prof. Dr. Martin Messerle

eingereicht: 18.02.2009

Datum der Promotion: 10.07.2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	TAXONOMISCHE EINORDNUNG	1
1.2	EPIDEMIOLOGISCHE ASPEKTE	2
1.3	DAS HUMANE CYTOMEGALIEVIRUS	4
1.3.1	<i>Aufbau und Struktur der Virionen</i>	4
1.3.2	<i>Aufbau des viralen Genoms</i>	5
1.4	INFEKTIONSZYKLUS UND VIRALE GENEXPRESSION	6
1.4.1	<i>Viruseintritt</i>	6
1.4.2	<i>Virale Genexpression und Replikation</i>	6
1.4.3	<i>Morphogenese</i>	8
1.5	DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM (UPS).....	9
1.5.1	<i>Aufbau des 26S Proteasoms</i>	10
1.5.2	<i>Rolle des Proteasoms in der Immunantwort</i>	11
1.5.3	<i>Klassifikation und Wirkungsweise von Proteasominhibitoren (PI)</i>	12
1.5.4	<i>Interaktion zwischen Viren und dem UPS</i>	12
1.6	PROBLEMSTELLUNG.....	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	MATERIALIEN.....	15
2.1.1	<i>Zellen</i>	15
2.1.2	<i>Virusstämme</i>	15
2.1.3	<i>HCMV BACs</i>	16
2.1.4	<i>Plasmide</i>	16
2.1.5	<i>Chemikalien</i>	17
2.1.6	<i>Kits</i>	18
2.1.7	<i>Antikörper</i>	18
2.1.7.1	<i>Primärantikörper</i>	18
2.1.7.2	<i>Sekundärantikörper</i>	21
2.1.8	<i>Enzyme</i>	21
2.1.9	<i>Inhibitoren</i>	21
2.1.9.1	<i>Proteasominhibitoren</i>	21
2.1.9.2	<i>Calpaininhibitoren</i>	22
2.1.9.3	<i>NF-κB Inhibitor SN50</i>	23
2.1.10	<i>Medien</i>	23
2.1.11	<i>Puffer und Lösungen</i>	24

2.1.11.1	Puffer und Lösungen für die Zellzucht	24
2.1.11.2	Lösung für den Plaquereduktionsassay.....	25
2.1.11.3	Puffer für die Gewinnung von Zellextrakten	25
2.1.11.4	Puffer für Western Blot-Analysen.....	26
2.1.11.5	Puffer für die Pulsfeldgelelektrophorese	26
2.1.11.6	Puffer für die Bestimmung der Proteasomaktivität.....	27
2.1.11.7	Lösungen für die Elektronenmikroskopie	28
2.1.12	<i>Sonstige Materialien</i>	28
2.1.13	<i>Geräte</i>	28
2.2	METHODEN	29
2.2.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	29
2.2.1.1	Zellkultur	29
2.2.1.2	Experimentelle HCMV-Infektion.....	30
2.2.1.3	Experimentelle VZV-Infektion	30
2.2.1.4	Anzucht und Titerbestimmung von HCMV	30
2.2.1.5	Titerbestimmung von VZV	31
2.2.1.6	Plaquereduktionsassay.....	32
2.2.1.7	Transiente Transfektion	32
2.2.1.8	Zytotoxizitätsbestimmung (XTT Assay)	33
2.2.1.9	Gewinnung von Zellextrakten	33
2.2.1.10	Gewinnung von Proteasom-Rohextrakten	34
2.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	34
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung.....	34
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.2.2.3	Immunoblot.....	36
2.2.2.4	Immunfluoreszenzfärbung	37
2.2.2.5	Pulsfeldgelelektrophorese	38
2.2.2.6	Elektronenmikroskopie	39
2.2.2.7	Bestimmung der CT-L Proteasomaktivität	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	EINFLUSS VON HCMV AUF DIE PROTEASOMAKTIVITÄT.....	41
3.1.1	<i>CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF</i>	41
3.1.2	<i>CT-L Proteasomaktivität in HELF nach Infektion mit UV-inaktiviertem HCMV</i>	42
3.1.3	<i>Zusammensetzung des Proteasoms in HCMV-infizierten HELF</i>	44
3.1.4	<i>Kinetik der CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF</i>	46
3.1.5	<i>Zeitliche Abhängigkeit der Induktion der CT-L Proteasomaktivität</i>	47
3.2	CHARAKTERISIERUNG DES ANTI-HCMV-EFFEKTS VON PROTEASOMINHIBITOREN (PI) ..	51
3.2.1	<i>Einfluss von PI auf die HCMV-Replikation</i>	51
3.2.2	<i>Einfluss von MG132 auf die VZV-Replikation</i>	54
3.2.3	<i>Einfluss von Calpaininhibitoren auf die HCMV-Replikation</i>	55
3.2.4	<i>Effekt von PI auf die Bildung infektiöser HCMV-Partikel</i>	58
3.2.5	<i>Effekt von MG132 auf den Viruseintritt in die Wirtszelle</i>	60

3.2.6	<i>Zeitliche Abhängigkeit des anti-HCMV-Effekts von MG132</i>	63
3.2.7	<i>Einfluss von PI auf die virale Proteinexpression</i>	65
3.2.7.1	Analyse der HCMV-Proteinexpression mittels Immunfluoreszenzfärbung	65
3.2.7.2	Analyse der HCMV-Proteinexpression mittels Western Blot	69
3.2.7.3	Analyse der Verzögerung der HCMV-Proteinexpression	74
3.2.8	<i>Einfluss von MG132 auf die Spaltung der konkatemeren HCMV-DNA</i>	76
3.2.9	<i>Einfluss von MG132 auf die virale DNA-Synthese</i>	78
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DES ANTI-HCMV-EFFEKTS VON PI	79
3.3.1	<i>Rolle des Transkriptionsfaktors NF-κB</i>	79
3.3.1.1	Einfluss von MG132 auf die IE1/2-Expression in RPE-Zellen	80
3.3.1.2	Einfluss von SN50 auf die HCMV-Replikation	82
3.3.1.3	Charakterisierung der HCMV Mutante HB5 Δ NF- κ B	86
3.3.2	<i>Rolle der ND10 Komponenten PML und hDaxx</i>	92
4	DISKUSSION	96
4.1	EINFLUSS VON HCMV AUF DIE PROTEASOMAKTIVITÄT	97
4.2	CHARAKTERISIERUNG DES ANTI-HCMV-EFFEKTS VON PI	101
4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DES ANTI-HCMV-EFFEKTS VON PI	110
5	ZUSAMMENFASSUNG	117
	LITERATUR	119
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	135
	ANHANG	139
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	140
	DANKSAGUNG	141

1 Einleitung

1.1 Taxonomische Einordnung

Das Humane Cytomegalievirus (HCMV) gehört zur Familie der Herpesviridae [Roizmann, 1992]. Charakteristisch für diese Virusfamilie ist die kaskadenartig regulierte Expression der viralen Proteine sowie die Etablierung lebenslanger Latenz nach der Primärinfektion, wobei die Viren in Nerven- oder lymphatischen Zellen persistieren, ohne dass damit eine Produktion infektiöser Partikel einhergeht. Die Einteilung der Herpesviridae beruht auf der Klassifikation durch die *Herpesvirus Study Group* des *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Aufgrund ihrer Pathogenität, ihres Wirtszell-tropismus und ihrer genetischen Eigenschaften (Konservierung von Gengruppen, genomische Organisation, Sequenzhomologien) lassen sie sich in α -, β - und γ -Herpesvirinae einteilen. Tabelle 1 zeigt die Zuordnung der humanpathogenen Spezies.

Tab. 1: Taxonomische Einordnung der humanpathogenen Herpesviren [Chang, 1994; Epstein, 1965; Frenkel, 1990; Josephs, 1986; Roizmann, 1992; Schneeweis, 1962; Smith, 1956].

Unterfamilie	Art	Kurzbezeichnung
α-Herpesvirinae	Humanes Herpesvirus 1 (Herpes-simplex-Virus 1)	HHV 1 (HSV-1)
	Humanes Herpesvirus 2 (Herpes-simplex-Virus 2)	HHV 2 (HSV-2)
	Humanes Herpesvirus 3 (Varizella-Zoster-Virus)	HHV 3 (VZV)
β-Herpesvirinae	Humanes Herpesvirus 5 (Humanes Cytomegalievirus)	HHV 5 (HCMV)
	Humanes Herpesvirus 6	HHV 6
	Humanes Herpesvirus 7	HHV 7
γ-Herpesvirinae	Humanes Herpesvirus 4 (Epstein-Barr-Virus)	HHV 4 (EBV)
	Humanes Herpesvirus 8	HHV 8

Die Mitglieder der α -Herpesvirinae (wie beispielsweise HSV-1, HSV-2 und VZV) zeichnen sich *in vivo* durch ein breites Wirtsspektrum und einen ausgeprägten Neurotropismus aus. Der *in vitro* Replikationszyklus ist vergleichsweise kurz (24 h) und führt zur Lyse der Wirtszelle.

Die Unterfamilie der β -Herpesvirinae, zu welcher das Humane Cytomegalievirus gehört, zeichnet sich *in vivo* durch ein enges Wirtsspektrum

aus. Der *in vitro* Replikationszyklus ist vergleichsweise lang (72 h) und endet ebenfalls mit der Lyse der Wirtszelle. Ein weiteres Merkmal der β -Herpesvirinae ist der charakteristische zytopathische Effekt der Virusinfektion. Dieser wird durch die Bildung von intranukleären und intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen hervorgerufen, welche zu einem Anschwellen und einer deutlichen Größenzunahme („Cytomegalie“) infizierter Zellen führen. Vertreter dieser Unterfamilie sind primär lymphotrop, können darüber hinaus jedoch weitere Gewebe wie z.B. das Retikulo-endotheliale System oder die Niere infizieren und dort persistieren.

Die Mitglieder der γ -Herpesvirinae (wie beispielsweise EBV) weisen *in vivo* ebenfalls ein enges Wirtsspektrum auf. Die Dauer des Replikationszyklus ist nicht einheitlich innerhalb der Unterfamilie. Vertreter der γ -Herpesvirinae infizieren überwiegend B- und T-Lymphozyten und besitzen ein onkogenes Potential.

1.2 Epidemiologische Aspekte

Das Humane Cytomegalievirus (HCMV) ist ein in allen sozioökonomischen Bevölkerungsschichten vorkommendes, ubiquitäres Pathogen. Die Seroprävalenz in der erwachsenen Bevölkerung liegt bei 50-60% in Industrieländern und bei nahezu 100% in Entwicklungsländern [Pass, 2001]. Die Primärinfektion immunkompetenter Individuen verläuft zumeist inapparent und führt zur lebenslangen Latenz des Virus in CD34⁺-Knochenmarkszellen, aus welchen das Virus sporadisch vor allem durch Stress oder systemische Entzündung reaktiviert werden kann [Döcke, 1994; Prösch, 2000]. HCMV-Reaktivierungen verlaufen meist ebenfalls symptomfrei; in seltenen Fällen können jedoch Fieber, Muskelschmerzen oder ein Mononukleose-ähnliches Krankheitsbild mit der Primärinfektion oder der Reaktivierung assoziiert sein [Cohen, 1985; Klemola, 1973].

Das Virus lässt sich in nahezu allen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Blut, Urin, Muttermilch, Zervixsekret und Samenflüssigkeit nachweisen und kann damit sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden [Forbes, 1989]. Die horizontale Übertragung des Virus erfolgt durch Tröpfcheninfektion,

Sexualkontakte, Organtransplantation sowie Kontakt mit infiziertem Blut und Blutprodukten. Zu den vertikalen Verbreitungswegen zählen die pränatale und die perinatale Übertragung sowie die postnatale Infektion von Säuglingen durch die Muttermilch. Eine Primärinfektion oder Reaktivierung bei der Mutter wird in ca. 40% der Fälle auf den Fötus übertragen [Eggers, 2001]; etwa 1-2% aller Neugeborenen sind bereits bei der Geburt mit HCMV infiziert. Von den infizierten Säuglingen weisen ca. 10% Symptome wie Wachstumsstörungen, Hepatosplenomegalie, Gelbsucht, Mikrozephalie und Chorioretinitis auf [Demmler, 1991]. Weitere 10% der infizierten Säuglinge sind von Spätschäden wie beispielsweise Schwerhörigkeit oder Taubheit bzw. anderen zentralnervösen Schädigungen betroffen [Britt, 1991; Revello, 2002].

Bei immunsupprimierten Patientengruppen wie Transplantatempfängern oder HIV-Patienten kann eine Primärinfektion oder Reaktivierung mit einer schwerwiegenden Erkrankung einhergehen. Das Krankheitsbild kann Symptome wie Retinitis, Exantheme oder Ösophagitis umfassen, aber auch lebensbedrohliche Komplikationen wie Pneumonien, Hepatitiden oder Enzephalitiden beinhalten [Balfour Jr., 1979; Cheung, 1999; Rowshani, 2005]. In der HCMV-Therapie werden gegenwärtig die Nukleosidanaloga Ganciclovir [Crumpacker, 1996], Valganciclovir [Curran, 2001] und Cidofovir [Hitchcock, 1996] sowie das Pyrophosphat analogon Foscarnet [Chrisp, 1991] eingesetzt, durch welche die Synthese viraler DNA inhibiert wird. Nachteilig beim Einsatz dieser Chemotherapeutika sind zum einen die durch Knochenmarks- oder Nephrotoxizität ausgelösten Nebenwirkungen [Curran, 2001; Deray, 1989]; zum anderen besteht die Gefahr der Selektion resistenter Virusmutanten [Erice, 1999; Lurain, 1994; Mercorelli, 2008].

Eine Immunprophylaxe steht bislang nicht zur Verfügung. Aktuelle Strategien zur Impfstoffentwicklung konzentrieren sich auf modulare Impfstoffe mit definierten immunogenen Bausteinen, die beispielsweise das virale Glykoprotein B (gB) enthalten, *dense body*-Vakzinen [Mersseman, 2008], DNA-Vektoren mit inserierten HCMV-Genen, Peptid-Vakzinen sowie attenuierte Lebendimpfstoffe [Schleiss, 2005; Zhong, 2005].

1.3 Das Humane Cytomegalievirus

1.3.1 Aufbau und Struktur der Virionen

Die Virionen des Humanen Cytomegalievirus (siehe Abb. 1) haben einen Durchmesser von 150-200 nm und setzen sich aus mehr als fünfzig verschiedenen Strukturproteinen zusammen.

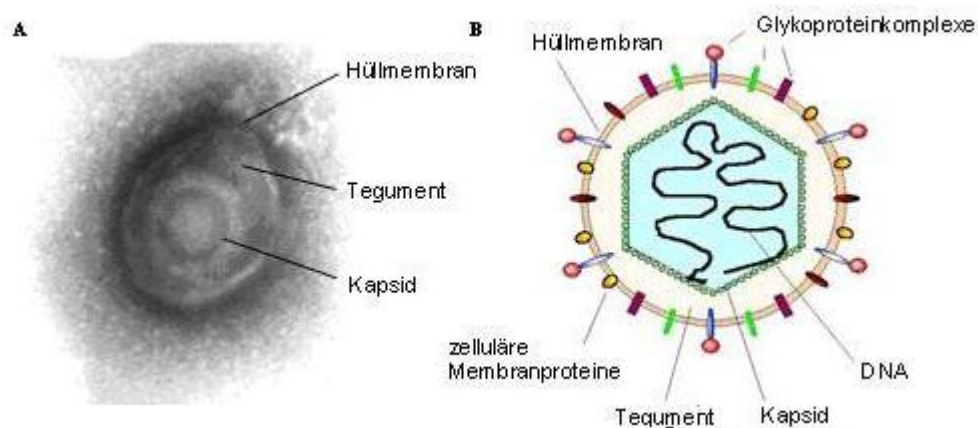


Abb. 1: (A) Elektronenmikroskopische und (B) schematische Darstellung des Humanen Cytomegalievirus (Quelle: E. Bogner).

Im Inneren der Viruspartikel befindet sich das 240 kb große, doppelsträngige, lineare DNA-Genom. Das virale Genom wird von dem aus 162 Kapsomeren bestehenden ikosaedrischen Kapsid umschlossen, welches wiederum von der Virushülle umgeben ist. Zwischen Kapsid und Hüllmembran befindet sich eine als Tegument bezeichnete, unstrukturierte Proteinmatrix. Dem Tegument konnten bislang ca. 20 virale Proteine zugeordnet werden, die Funktionen bei der Morphogenese [Baxter, 2001; Meyer, 1997], dem Virustransport [Sinzger, 2000], der Immunmodulation [Browne, 2003; Child, 2004] oder der Initiation der viralen Genexpression ausüben [Liu, 1992; Winkler, 1995]. In die Virushülle ist eine Vielzahl von komplexartig organisierten viralen Glykoproteinen inseriert. Der Glykoproteinkomplex I ist ein Homodimer des Glykoproteins gB [Britt, 1985]. Die Glykoproteine gM und gN bilden den Glykoproteinkomplex II [Mach, 2000]. Der Glykoproteinkomplex III besteht aus den Glykoproteinen gH, gL und gO [Huber, 1998; Li, 1997]. Die Glykoproteinkomplexe sind an der Adsorption des Virus, der Fusion von

Virushülle und Plasmamembran, der Zell-Zell-Fusion sowie dem *Budding* an der inneren Kernmembran beteiligt (siehe Abschnitt 1.4.1).

Neben infektiösen Virionen entstehen bei der Virusreplikation auch nicht-infektiöse Partikel wie beispielsweise *dense bodies* oder *non-infectious enveloped particles* (NIEPs). Während *dense bodies* nur aus Hüllmembran und Tegumentproteinen bestehen, enthalten NIEPs zwar zusätzlich ein Kapsid, jedoch keine virale DNA [Irmiere, 1983; Sarov, 1975].

1.3.2 Aufbau des viralen Genoms

Das HCMV-Genom besitzt mit ca. 240 kb und einem Molekulargewicht von 1.5×10^8 Dalton die größte Kodierungskapazität innerhalb der Familie der Herpesviridae [Bankier, 1991; Chee, 1990]. Es besteht aus zwei nicht-repetitiven Bereichen, dem *unique long* (U_L)- und dem *unique short* (U_S)-Segment, die von repetitiven Sequenzen, den *terminal repeats* (TR_L , TR_S) und den *internal repeats* (IR_L , IR_S), flankiert werden (siehe Abb. 2). Entsprechend der Nomenklatur dieser Genomabschnitte werden die viralen Gene mit den Präfixen TRS, TRL, IRS, IRL, UL oder US bezeichnet. Durch intramolekulare Rekombination der invertierten Wiederholungseinheiten ($a_nb - b'a'_m$ sowie $a'_mc - c'a$) können vier isomere Formen des Genoms entstehen, die in äquimolarem Verhältnis in allen HCMV-Populationen vorkommen [Liu, 1992; Stinski, 1981].

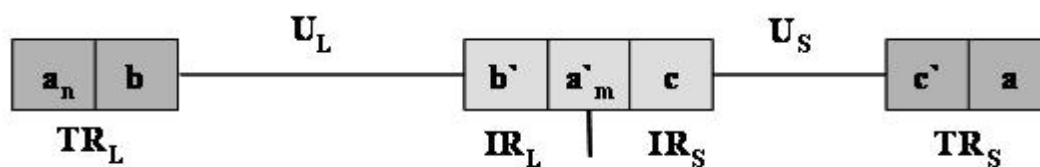


Abb. 2: Schematische Darstellung der Genomorganisation von HCMV. Das virale Genom besteht aus zwei nicht-repetitiven Segmenten, dem U_L (*unique long*)- und dem U_S (*unique short*)-Segment, die an den Enden von repetitiven Sequenzen, den *terminal repeats* (TR) und den *internal repeats* (IR), flankiert werden. Die Bezeichnungen a_n , a'_m und a (bzw. b und b' ; c und c') stellen identische Basenabfolgen dar, die invertiert zueinander vorliegen (Quelle: E. Bogner).

1.4 Infektionszyklus und virale Genexpression

1.4.1 Viruseintritt

HCMV kann *in vivo* ein breites Spektrum von Zelltypen wie Makrophagen, Muskelzellen, Leberzellen und Pneumozyten sowie Epithel- und Endothelzellen produktiv infizieren [Plachter, 1996; Sinzger, 1995]. Aufgrund dieses Charakteristikums wird vermutet, dass HCMV mehrere unterschiedliche oder ein ubiquitär vorkommendes Oberflächenmolekül als zellulären Rezeptor nutzt. Als potentielle Rezeptoren werden vor allem der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), der *platelet-derived growth factor-alpha receptor* (PDGFR-alpha) sowie verschiedene Integrine diskutiert [Isaacson, 2007; Soroceanu, 2008; Wang, 2005; Wang, 2003]. Zunächst wird der Kontakt zur Wirtszelle über die unspezifische Bindung von gB und weiteren viralen Glykoproteinen an Heparansulfatproteoglykane auf der Zelloberfläche hergestellt [Boyle, 1998; Compton, 1993]. Nach der Bindung von gB an den Wirtszellrezeptor erfolgt die pH-unabhängige Fusion der Zellmembran mit der Virushülle [Bold, 1996; Lopper, 2004; Reschke, 1995]. Dabei werden Kapsid und Tegument in das Zytoplasma eingebracht. An den Kernporen wird das virale Genom in das Nukleoplasma entlassen, wo es zirkularisiert.

1.4.2 Virale Genexpression und Replikation

Im Kern erfolgt die zeitlich geordnete und kaskadenartig organisierte Expression des viralen Genoms unter Mitwirkung einer Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren [Wathen, 1982]. Die Produkte der vorangegangenen Expressionsphase wirken dabei regulierend auf die Proteinexpression der nachfolgenden Phase (siehe Abb. 3).

Schon 30 min nach Infektion der Wirtszelle beginnt die Transkription der sehr frühen (*immediate early*, *IE*) Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Das virale Tegumentprotein pp71 fungiert dabei als Transaktivator [Bresnahan, 2000]. Zur Gruppe der *immediate early*-Gene gehören unter anderem die offenen Leserahmen *UL122* und *UL123*. Die Expression dieser

Gene unterliegt der Kontrolle des außergewöhnlich starken *major immediate early* (MIE)-Promotors und dessen Enhancers. Der MIE-Enhancer ist ein Kontrollelement von großer Komplexität und weist eine hohe Dichte an Bindungsmotiven für zelluläre und virale Transkriptionsfaktoren auf. Die Bindungsstellen für zelluläre Transaktivatoren wie CREB/ATF, AP-1, SP-1 und NF- κ B bestehen aus repetitiven Elementen, die aufgrund ihrer Länge als 17 bp-, 18 bp-, 19 bp- und 21 bp-Motive bezeichnet werden [Boshart, 1985; Meier, 1996; Thomsen, 1984]. Durch verschiedene Transkriptionsstartpunkte sowie alternatives Spleißen der Transkripte gehen aus der MIE-Region insgesamt vier Proteine hervor. Die am stärksten exprimierten MIE-Proteine sind IE1_{491AS} und IE2_{579AS}, welche nicht nur die Transkription der frühen (*early*, *E*) und späten (*late*, *L*) viralen Gene induzieren, sondern auch die Expression zahlreicher zellulärer Proteine beeinflussen [Geballe, 1986; Spaete, 1985]. Die nachfolgende frühe Phase umfasst den Zeitraum von 3-36 h *post infectionem* (p.i.). Während dieser Phase wird der größte Teil der viralen Gene transkribiert. Die frühen Gene kodieren vor allem für Proteine, die am Nukleotidstoffwechsel, der viralen DNA-Replikation oder der Immunevasion beteiligt sind [Bodaghi, 1998; Mocarski, 2001]. Zu den frühen Proteinen gehören unter anderem das DNA-Einzelstrang-bindende Protein pUL57 sowie die virale DNA-Polymerase pUL54 und deren Prozessivitätsfaktor pUL44. Die Replikation des Genoms (ab 14-16 h p.i.) erfolgt nach dem *rolling circle*-Prinzip [Huang, 1973; Stinski, 1981] in bestimmten Arealen des Zellkerns, die als Replikationszentren bezeichnet werden [Ahn, 1999; de Bruyn Kops, 1998]. Der dabei gebildete lineare DNA-Strang besteht aus vielfach aneinander gereihten Einheiten des Virusgenoms, den so genannten Konkatemeren. Im Anschluss an die Replikation der viralen DNA erfolgt die Transkription der späten Gene. Die in dieser Phase exprimierten Proteine lassen sich in *early late*- und *true late*-Proteine unterteilen. Die Transkription der *early late*-Gene beginnt 12 h p.i. und findet auch – allerdings in vermindertem Maße – statt, wenn die virale DNA-Replikation inhibiert ist. Im Gegensatz dazu ist der Abschluss der viralen DNA-Replikation Voraussetzung für die Expression der *true late*-Proteine, die ab 24 h p.i. beginnt. Zu den späten Genprodukten zählen in erster Linie

Strukturproteine wie Kapsid-, Tegument- und Membranproteine [Mocarski, 2001].

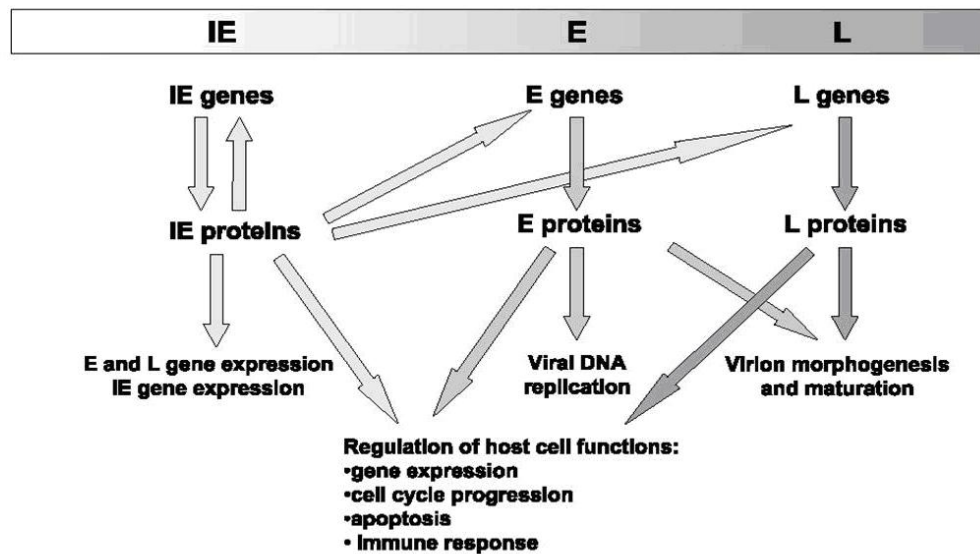


Abb. 3: Organisation der viralen Genexpression und Funktion der viralen Genprodukte [Landolfo, 2003].

1.4.3 Morphogenese

Die Morphogenese findet im Kern der Wirtszelle statt und beginnt mit der Assemblierung der Kapsidproteine. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen können drei verschiedene Kapsidtypen unterschieden werden: A-, B- und C-Kapside. Die DNA-freien A-Kapside entstehen vermutlich durch abortive DNA-Verpackung. Bei B-Kapsiden handelt es sich um DNA-freie Pro-Kapside, die noch das Gerüstprotein (*scaffolding protein*) enthalten [Welch, 1991]. Die korrekte DNA-Verpackung führt zur Bildung von C-Kapsiden. Dabei wird die konkatemere virale DNA durch die Terminase zunächst in einzelne Genomeinheiten gespalten, welche dann unter ATP-Verbrauch über das Portalprotein pUL104 in die Kapside inseriert werden [Dittmer, 2005a; Dittmer, 2005b]. Die virale Terminase besteht aus der großen Untereinheit pUL56, welche die Bindung zwischen DNA und Pro-Kapsid vermittelt und deren ATPase-Aktivität die Energie für die Insertion der DNA in die Kapside bereitstellt sowie der kleinen Untereinheit pUL89, welche die Spaltung der Konkatemere katalysiert [Bogner, 1998; Scheffczik, 2002]. Nach Knospung

der Kapside an der Kernmembran und Anlagerung von Tegumentproteinen erfolgt die endgültige Umhüllung der Kapside an den Zisternen des tubulären Endosoms oder des Trans-Golgi-Netzwerks, in deren Membranen virale Glykoproteine inseriert sind [Radsak, 1996; Tooze, 1993]. Die reifen Viruspartikel werden schließlich ab 72 h p.i. über Exozytose in den extrazellulären Raum entlassen [Mettenleiter, 2002].

1.5 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist ein in allen Eukaryoten vorkommendes hochkonserviertes System zum gezielten Abbau von Proteinen. Das UPS reguliert zum einen die Degradation fehlgefalteter oder defekter Proteine. Zum anderen spielt das UPS durch die selektive Degradation von Proteinen eine Schlüsselrolle bei der Regulierung einer Vielzahl essentieller zellulärer Prozesse wie Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose, Antigenpräsentation und DNA-Reparatur [Rivett, 2004; Varshavsky, 1997; Wang, 1998a; Wu, 2002]. Die abzubauenen Proteine werden dabei in einer koordinierten Abfolge enzymatischer Reaktionen mit multiplen Ubiquitinresten kovalent verknüpft. Zunächst wird freies Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 ATP-abhängig aktiviert. Anschließend erfolgt der Transfer des aktivierten Ubiquitinmoleküls auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2). Das E2-Enzym transferiert das Ubiquitin entweder auf eine Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) oder direkt - mit Hilfe der E3-Ligase - auf einen internen Lysinrest des Substrats [Ciechanover, 2005]. In höheren Eukaryoten gibt es nur ein E1-Enzym, jedoch zahlreiche E2-Enzyme und weit über hundert verschiedene E3-Ligasen, welche die Spezifität der Ubiquitinmarkierung gewährleisten. Mehrere Durchläufe dieser Kaskade führen zur multiplen Ubiquitinierung der abzubauenen Proteine. Die Poly-Ubiquitinketten dienen als Signal für die Substraterkennung durch die regulatorischen Untereinheiten des 26S Proteasoms. Einige Proteine können jedoch auch Ubiquitin-unabhängig vom Proteasom degradiert werden [Sheaff, 2000]. Die Mono-Ubiquitinierung von Proteinen scheint Proteasom-unabhängige, regulatorische Funktionen zu erfüllen [Conaway, 2002].

1.5.1 Aufbau des 26S Proteasoms

Der multimere und multikatalytische 26S Proteasom-Komplex befindet sich sowohl im Zytoplasma als auch im Kern eukaryotischer Zellen. Er besteht aus einer zentralen Zylinder-förmigen 20S Untereinheit, die an beiden Enden von je einer regulatorischen 19S Untereinheit flankiert wird (siehe Abb. 4).

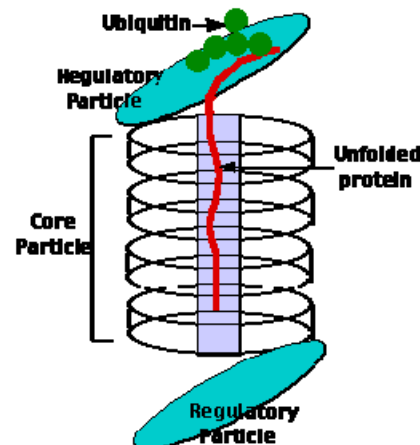


Abb. 4: Aufbau des 26S Proteasoms. Das 26S Proteasom besteht aus der zentralen 20S Untereinheit, welche von den regulatorischen 19S Untereinheiten flankiert wird. Die 20S Untereinheit setzt sich aus vier heptameren Proteinringen zusammen und beherbergt die katalytisch aktiven Zentren des Proteasoms. (Quelle: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Proteasome.html>)

Die 19S Untereinheiten erkennen und binden ubiquitinierte Substrate und verfügen darüber hinaus über eine ATPase-Aktivität, welche die Entfaltung der Proteine vor der Einschleusung in das Innere der 20S Untereinheit gewährleistet [Coux, 1996]. Die 20S Untereinheit setzt sich aus vier symmetrisch angeordneten heptameren Proteinringen zusammen [Elliott, 2003; Groll, 1997]. Die äußeren α -Ringe bestehen jeweils aus den Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 7$, die als stabilisierendes „Gerüst“ dienen und den Zugang zu den katalytischen Zentren kontrollieren. Die beiden inneren β -Ringe setzen sich jeweils aus den Untereinheiten $\beta 1$ - $\beta 7$ zusammen, wobei die Untereinheiten $\beta 1/\delta$, $\beta 2/Z$ und $\beta 5/MB1$ katalytisch aktiv sind und unterschiedliche Spaltpräferenzen besitzen. Nach Art der Spaltung der Substrate unterscheidet man eine Chymotrypsin-ähnliche (CT-L, $\beta 5/MB1$), eine Trypsin-ähnliche (T-L, $\beta 2/Z$) sowie eine Peptidylglutamyl-Peptid-hydrolysierende (PGPH, $\beta 1/\delta$) katalytische Aktivität.

1.5.2 Rolle des Proteasoms in der Immunantwort

Neben dem konstitutiven Proteasom (siehe Abschnitt 1.5.1) existiert in Vertebraten ein weiterer Typ des 20S Proteasoms – das Immunproteasom (siehe Abb. 5). Inflammatorische Zytokine wie Interferon- α/β oder Interferon- γ dienen als Signal für die Bildung des Immunproteasoms und induzieren die Synthese homologer, enzymatisch aktiver β -Untereinheiten ($\beta 1i$ /LMP2, $\beta 2i$ /MECL1 und $\beta 5i$ /LMP7). Im Immunproteasom ersetzen diese alternativen Untereinheiten ihre konstitutiven Homologen [Eleuteri, 1997; Shin, 2006; Toes, 2001; Ustrell, 1995]. Dadurch ergibt sich ein verändertes Profil der proteolytischen Aktivitäten. Das Immunproteasom verfügt über eine gesteigerte CT-L Aktivität und dient vor allem zur Generierung von antigenen Peptiden zytoplasmatischer Proteine für die Antigenpräsentation über MHC Klasse-I Moleküle [Chen, 2001; Rock, 1999].

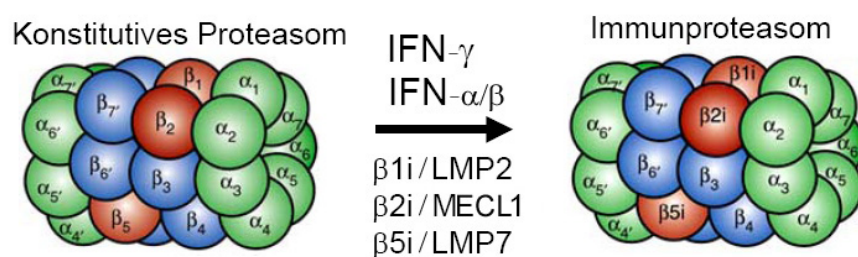


Abb. 5: Konstitutives Proteasom und Immunproteasom. Inflammatorische Zytokine wie IFN- α/β oder IFN- γ induzieren die Expression der Immunproteasomuntereinheiten $\beta 1i$ /LMP2, $\beta 2i$ /MECL1 und $\beta 5i$ /LMP7, welche die homologen Untereinheiten im konstitutiven Proteasom ersetzen (nach E. Krüger).

Darüber hinaus ist das 26S Proteasom an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) beteiligt. Dieser spielt eine Schlüsselrolle bei inflammatorischen Prozessen und liegt in unstimulierten Zellen im Komplex mit dem Inhibitor I- κ B inaktiv im Zytoplasma vor. NF- κ B kann sich aus verschiedenen Mitgliedern der NF- κ B/Rel-Proteinfamilie zusammensetzen; die Regulation pro-inflammatorischer Gene erfolgt jedoch hauptsächlich durch das p65/p50-Heterodimer [Li, 2002; Silverman, 2001]. Extrazelluläre Signale wie pro-inflammatorische Zytokine oder Pathogen-assoziierte molekulare Muster bewirken die Induktion einer Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung von I- κ B-Kinasen (IKK) führt

[Mercurio, 1997]. Nach IKK-vermittelter Phosphorylierung von I- κ B und anschließender Ubiquitinierung wird der Inhibitor schließlich durch das Proteasom abgebaut [Karin, 2000]. Freigesetztes NF- κ B gelangt in den Zellkern und induziert dort die Transkription der entsprechenden Zielgene wie beispielsweise Interleukin-1, TNF- α , ICAM und VCAM [Rock, 1999].

1.5.3 Klassifikation und Wirkungsweise von Proteasom-inhibitoren (PI)

Das 26S Proteasom gehört zur Klasse der Threonin-Proteasen, da ein N-terminal gelegener Threoninrest des katalytischen Zentrums als Nukleophil bei der Spaltung der Peptidbindung fungiert [Myung, 2001]. Diese Art der Proteolyse unterscheidet sich von der Wirkungsweise vieler anderer zellulärer Proteasen und ermöglicht die relativ spezifische Hemmung des Proteasoms. Neben natürlich vorkommenden Proteasominhibitoren (PI) wie Lactacystin (aus *Streptomyces lactacystinaeus*) und Epoxomizin (aus *Actinomycetes*) ist heute eine Vielzahl rational entworfener, synthetischer PI verfügbar [Fenteany, 1995; Kisselev, 2001; Meng, 1999]. Eine wichtige Klasse von synthetischen PI stellen die Peptidaldehyde dar, welche vor allem die CT-L Aktivität des Proteasoms hemmen. Dabei blockiert der Peptidanteil des Inhibitors die Substratbindungstasche, während die reaktive Aldehydgruppe sich mit dem Threoninrest des katalytischen Zentrums zu einem Hemiazetal verbindet. Vertreter dieser Klasse sind die Inhibitoren BSc2118 und MG132 (siehe Abschnitt 2.1.9.1). Die Hemmung des Proteasoms durch Peptidaldehyde ist unter physiologischen Bedingungen reversibel.

1.5.4 Interaktion zwischen Viren und dem UPS

Viren sind im Rahmen ihrer Vermehrung auf die Wirtszelle angewiesen. Zur Optimierung des zellulären Milieus für ihre Replikation und bei der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem manipulieren sie auch das UPS. So kodieren einige Viren für E3-Ligasen, wie für das E6-Protein des Humanen Papillomvirus und die adenoviralen Proteine E1B55k und E4orf6 bereits gezeigt werden konnte, welche den Proteasom-vermittelten Abbau des

zellulären Tumorsuppressorproteins p53 induzieren [Banks, 2003; Scheffner, 1993]. Auch für HCMV wurden bereits Manipulationen des UPS beschrieben. So induziert das Tegumentprotein pp71 direkt nach Infektion der Wirtszelle die Proteasom-abhängige Degradation des zellulären Repressorproteins hDaxx und leitet auf diese Weise die Transkription der *immediate early*-Gene ein [Saffert, 2006]. Des Weiteren ist auch der durch die HCMV-Proteine US2 und US11 stimulierte Abbau von MHC Klasse-I Komplexen im Rahmen der Immunevasion an das Proteasomsystem gekoppelt [Wiertz, 1996].

In Studien mit Proteasominhibitoren (PI) wurde ferner deutlich, dass Replikation und Bildung infektiöser Nachkommenviren ebenfalls vom UPS abhängen können. Der Mechanismus der antiviralen Wirkung von PI unterscheidet sich dabei stark zwischen den einzelnen Virusfamilien. So wird bei Influenza der Eintritt der Viren in die Zelle gehemmt [Khor, 2003]. Für HSV-1 wurde kürzlich gezeigt, dass PI den Transport der Kapside zum Kern blockieren [Delboy, 2008]. Zudem ist die Expression der HSV-1 *immediate early*- und *late*-Proteine in PI-behandelten Zellen verringert [La Frazia, 2006]. Auch beim *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) konnte die Expression viraler Proteine durch PI gehemmt werden [Neznanov, 2008]. Für Coxsackievirus B3 wurde eine Hemmung der Transkription und Translation viraler Proteine sowie eine reduzierte Spaltung des Vorläufer-Polyproteins beschrieben [Luo, 2003; Wong, 2007]. Die Spaltung des Gag-Vorläuferproteins von HIV-1 und -2 kann ebenfalls durch PI gehemmt werden, woraus eine stark verminderte Freisetzung und Infektiosität der Nachkommenviren resultiert [Schubert, 2000; Strack, 2000]. Darüber hinaus scheinen PI auch mit späten Ereignissen im viralen Replikationszyklus zu interferieren wie beispielsweise der Reifung bei Paramyxoviren oder dem *Budding* bei Rhabdoviren [Harty, 2001].

Für HCMV konnte kürzlich gezeigt werden, dass PI die virale Replikation blockieren und dass vor allem die Expression des sehr frühen Proteins IE2 unterdrückt ist, während die Expression von IE1 unverändert bleibt [Prösch, 2003]. Ferner wurde die Hypothese aufgestellt, dass die beobachtete Reduktion der *early*- und *late*-Genexpression sowie der viralen DNA-Synthese auf der Hemmung der IE2-Expression beruht [Prösch, 2003].

1.6 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von HCMV auf das Proteasom und den anti-HCMV-Effekt von Proteasominhibitoren (PI) detailliert zu charakterisieren. Durch Bestimmung der Proteasomaktivität soll zunächst geklärt werden, ob diese in infizierten Zellen im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen verändert ist. Ferner soll der Frage nachgegangen werden, ob das Proteasom in infizierten Zellen in seiner konstitutiven Form oder als Immunproteasom vorliegt.

In Studien mit PI soll mittels Elektronenmikroskopie zunächst untersucht werden, ob es in Anwesenheit von PI zur Bildung infektiöser Nachkommen-viren kommt. Da bisher lediglich bekannt ist, dass PI die Expression der viralen Proteine IE2, pUL44 und pp65 vermindern [Prösch, 2003], soll darüber hinaus der Einfluss von PI auf die Expression weiterer *early*- und *late*-Proteine mittels Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen charakterisiert werden. Ferner soll untersucht werden, wie sich die Hemmung des Proteasoms auf die virale DNA-Synthese auswirkt. Dazu sollen Studien mit dem Nukleosidanalogen BrdU, welches durch den HCMV-vermittelten *virus host shutoff* überwiegend in neu synthetisierte virale DNA eingebaut wird, durchgeführt werden. Der Einfluss von PI auf die Spaltung konkatemerer viraler DNA soll mittels Pulsfeldgelelektrophorese untersucht werden, da mit dieser Methode große DNA-Fragmente aufgetrennt werden können.

Schließlich soll der Frage nachgegangen werden, durch welchen Mechanismus PI die Virusreplikation unterdrücken. Dabei soll zunächst analysiert werden, ob der anti-HCMV-Effekt von PI auf der Hemmung des zellulären Transkriptionsfaktors NF- κ B beruht. Zur Aufklärung dieser Fragestellung soll der Einfluss von PI auf die Replikation und Proteinexpression einer Virusmutante, bei welcher die NF- κ B-Bindestellen im MIE Enhancer/Promotor deletiert sind, untersucht werden. Parallel dazu soll abgeschätzt werden, ob der anti-HCMV-Effekt von PI durch die Stabilisierung von zellulären Transkriptionsrepressoren wie beispielsweise PML oder hDaxx erklärt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellen

Humane Vorhautfibroblasten mit *knockdown* zellulärer Proteine (kd-HFF)

Primäre humane Vorhautfibroblasten (HFF), die stabil mit Retroviren transduziert wurden, welche keine siRNA (Vektor), nicht-funktionelle siRNA (siC) oder siRNA gegen die zellulären Proteine PML (siPML2) bzw. hDaxx (siDaxx1) exprimieren [Tavalai, 2006]. Alle stabil transduzierten HFF wurden freundlicherweise von T. Stamminger, Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt.

Humane Lungenfibroblasten (HELFL)

Primäre humane Lungenfibroblasten, die aus dem Lungengewebe eines abortierten Fötus isoliert wurden.

Retinale Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen)

Retinale Pigmentepithelzellen, die aus der Retina eines Spenders für eine Hornhauttransplantation isoliert wurden.

2.1.2 Virusstämme

HCMV AD169

Laborstamm des Humanen Cytomegalievirus [Rowe, 1956].

VZV JoSt

Klinisches Isolat (Wildtyp) des Varizella-Zoster-Virus (freundlicherweise von C. Gutzeit, Institut für Medizinische Virologie der Charité zu Berlin zur Verfügung gestellt).

VZV Oka

Attenuierter Vakzinestamm des Varizella-Zoster-Virus [Takahashi, 1975].

2.1.3 HCMV BACs**HB5**

Das HCMV BAC HB5 kodiert für das gesamte Genom (Wildtyp) des HCMV Laborstammes AD169 [Borst, 1999].

HB5-GFP

Das HCMV BAC HB5-GFP trägt eine *enhanced green fluorescent protein* (eGFP)-exprimierende Kasette unter Kontrolle des MIEP des Murinen Cytomegalievirus (MCMV) zwischen den offenen Leserahmen *US1* und *US12* (freundlicherweise von M. Messerle, Institut für Virologie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt).

HB5 Δ NF- κ B

Im HCMV BAC HB5 Δ NF- κ B sind die vier putativen NF- κ B-Bindungsstellen im MIE-Enhancer/Promotor durch ortsgerichtete Mutagenese zerstört (Konstruktion siehe [Kaspari, 2008], freundlicherweise von A. Zimmermann, Institut für Virologie der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt).

2.1.4 Plasmide**pG305**

Eukaryotisches Expressionsplasmid (siehe Abb. 6), welches für die HCMV-Proteine IE1 und IE2 unter Kontrolle des MIE-Enhancer/Promotors kodiert (freundlicherweise durch S. Prösch zur Verfügung gestellt).

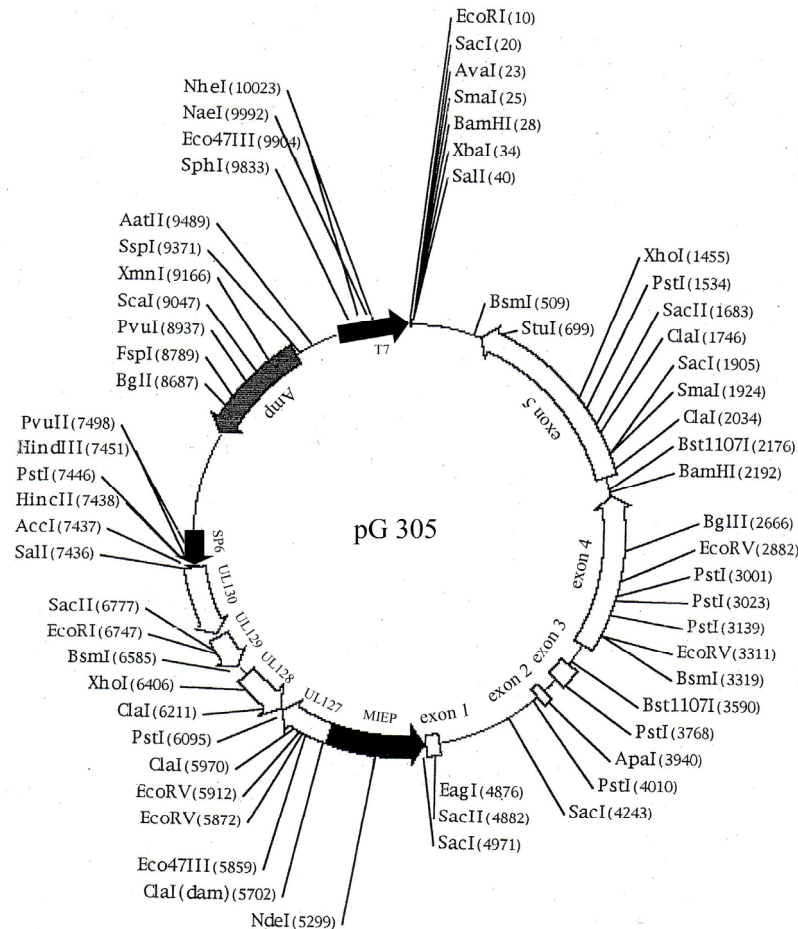


Abb. 6: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pG305. Das Plasmid kodiert für die HCMV-Proteine IE1/2 (Exon 1-5) unter Kontrolle des MIE-Enhancer/Promotors sowie für die HCMV-Proteine pUL130-128 unter Kontrolle des SP6-Promotors. Der offene Leserahmen UL127 befindet sich unter der Kontrolle des T7-Promotors. Für die Selektion in Bakterien besitzt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen.

2.1.5 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Fluka Chemie GmbH (Buchs) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Chemikalie

Aprotinin

BDMA

Bradford-Lösung

Hersteller

Roth, Karlsruhe

Agar Scientific, Cambridge

Biorad, München

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
DABCO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fluoprep™	BioMérieux, Marcy l'Etoile
FKS	Biochrom, Berlin
Gentamycinsulfat	Cambrex, Taufkirchen
Heparin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lambda Ladder PFG Marker	New England Biolabs, Frankfurt am Main
LMP Agarose (Seaplaque GTG)	Biorad, München
Methylzellulose	Fluka, Buchs
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Puromycin	Invivogen, San Diego
Suc-LLVY-AMC	Bachem, Bubendorf

2.1.6 Kits

AEC Staining Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
SuperSignal West Dura	Pierce, Bonn
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche, Mannheim

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

Monoklonale Antikörper

anti-BrdU-Antikörper: Isoliert aus Mäusen (Klon BRD-3; Dianova, Hamburg). Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz 1:200 verdünnt eingesetzt.

anti- β -Aktin-Antikörper: Isoliert aus Ziegen (Klon C11; Santa Cruz, Wien). Der Antikörper wurde im Western Blot 1:1.000 verdünnt eingesetzt.

anti-MB1-Antikörper: Isoliert aus Mäusen (Klon SJJ-3; freundlicherweise von D. Siele, Institut für Biochemie der Charité zu Berlin zur Verfügung gestellt). Der Antikörper wurde im Western Blot 1:5.000 verdünnt verwendet.

anti-alpha 4-Antikörper: Isoliert aus Mäusen (Klon MCP34, Santa Cruz, Wien). Der Antikörper wurde im Western Blot 1:1.000 verdünnt eingesetzt.

anti-NF- κ B p50-Antikörper: Isoliert aus Mäusen (Klon E10, Santa Cruz, Wien). Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz 1:50 verdünnt verwendet.

mAb M23: Maus-anti-pUL112/113-Antikörper [Yamamoto, 1998]. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz unverdünnt verwendet.

mAb p63-27: Maus-anti-IE1-Antikörper [Andreoni, 1989], bezogen von T. Stamminger, Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz und im Plaquereduktionsassay unverdünnt eingesetzt.

mAb SMX: Maus-anti-IE2-Antikörper, bezogen von B. Plachter, Institut für Virologie der Universität Mainz. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz unverdünnt verwendet.

mAb E13: Maus-anti-IE1/2-Antikörper, bezogen von Oxford Technology. Der Antikörper wurde im Western Blot 1:400 verdünnt und im Plaquereduktionsassay 1:100 verdünnt verwendet.

mAb 27-156: Maus-anti-gB-Antikörper, bezogen von W. Britt, University of Alabama, Birmingham. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz unverdünnt eingesetzt.

mAb 28-4: Maus-anti-MCP-Antikörper, bezogen von W. Britt, University of Alabama, Birmingham. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz und im Western Blot unverdünnt verwendet.

mAb 58-15: Maus-anti-pp65-Antikörper, bezogen von W. Britt, University of Alabama, Birmingham. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz 1:10 verdünnt und im Western Blot unverdünnt eingesetzt.

mAb 41-18: Maus-anti-pp28-Antikörper, bezogen von W. Britt, University of Alabama, Birmingham. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz unverdünnt verwendet.

mAb BS510: Maus-anti-pUL44-Antikörper, bezogen von W. Britt, University of Alabama, Birmingham. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz und im Western Blot unverdünnt verwendet.

Polyklonale Antikörper

anti-LMP2-Antikörper: Isoliert aus Kaninchen (abcam, Cambridge). Der Antikörper wurde im Western Blot 1:1.000 verdünnt eingesetzt.

anti-delta-Antikörper: Isoliert aus Kaninchen (pAb K43/7, freundlicherweise von D. Siele, Institut für Biochemie der Charité zu Berlin zur Verfügung gestellt). Der Antikörper wurde im Western Blot 1:1.000 verdünnt eingesetzt.

anti-LMP7-Antikörper: Isoliert aus Kaninchen (abcam, Cambridge). Der Antikörper wurde im Western Blot 1:1.000 verdünnt eingesetzt.

pAbUL56: Humanes pUL56-Antiserum [Giesen, 2000]. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz 1:10 verdünnt eingesetzt.

pAbUL89: Humanes pUL89-Antiserum [Hwang, 2001]. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz unverdünnt eingesetzt.

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Einsatz in der Immunfluoreszenz:

Anti-Maus F(ab')₂ Fragmente, CyTM3 konjugiert (1:300 verdünnt), bezogen von Dianova, Hamburg.

Anti-Maus F(ab')₂ Fragmente, CyTM2 konjugiert (1:200 verdünnt), bezogen von Dianova, Hamburg.

Anti-Human F(ab')₂ Fragmente, CyTM3 konjugiert (1:300 verdünnt), bezogen von Dianova, Hamburg.

Einsatz im Western Blot:

Anti-Maus IgG (H+L), HRP-konjugiert, (1:4.000 verdünnt), bezogen von
Pierce, Bonn.

Anti-Kaninchen IgG (H+L), HRP-konjugiert, (1:3.000 verdünnt), bezogen von Biorad, München.

Anti-Ziege IgG (H+L), HRP-konjugiert, (1:3.000 verdünnt), bezogen von Santa Cruz, Wien.

Einsatz im Plaquereduktionsassay:

Anti-Maus IgG (H+L), HRP-konjugiert, (1:500 verdünnt), bezogen von Sigma-Aldrich, Steinheim.

2.1.8 Enzyme

Proteinase K Invitrogen, Karlsruhe

Trypsin Roth, Karlsruhe

2.1.9 Inhibitoren

2.1.9.1 Proteasominhibitoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Proteasominhibitoren aus den Klassen der Peptidaldehyde (MG132, BSc2118), Peptidboronate (MG262) und β -Lactone (Lactacystin) eingesetzt (siehe Abb. 7). MG132 wurde in 95%

(v/v) Ethanol gelöst. BSc2118, MG262 und Lactacystin wurden in DMSO gelöst. Stammlösungen der Proteasominhibitoren wurden bei -20°C gelagert. Die Verdünnung der Stammlösungen bis zur jeweiligen Arbeitskonzentration erfolgte in *Aqua dest.* MG132, MG262 und Lactacystin wurden von Biomol, Hamburg bezogen. BSc2118 wurde freundlicherweise von U. Kuckelkorn, Institut für Biochemie der Charité zu Berlin zur Verfügung gestellt.

MG132: Z-Leu-Leu-Leu-CHO, reversible Hemmung des Proteasoms

MG262: Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂, reversible Hemmung des Proteasoms

Lactacystin: C₁₅H₂₄N₂O₇S, irreversible Hemmung des Proteasoms

BSc2118: unbekannte Strukturformel, reversible Hemmung des Proteasoms

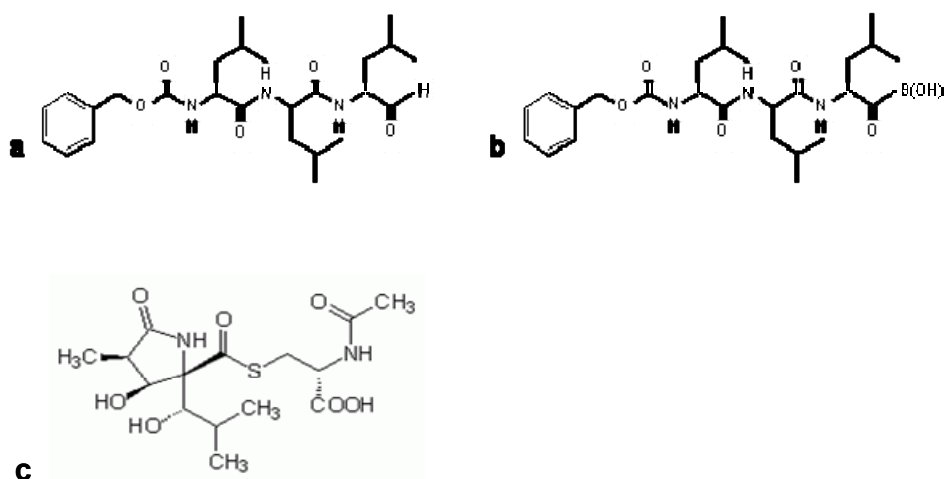


Abb. 7: Schematische Darstellung der verwendeten Proteasominhibitoren. (a) MG132, (b) MG262, (c) Lactacystin.

2.1.9.2 Calpaininhibitoren

Calpaininhibitor I und II (siehe Abb. 8) wurden von Biomol, Hamburg bezogen. Beide Calpaininhibitoren wurden in DMSO gelöst. Stammlösungen der Calpaininhibitoren wurden bei -20°C gelagert. Beide Calpaininhibitoren hemmen die Aktivität der zellulären Proteasen Calpain I und II sowie Cathepsin B und L.

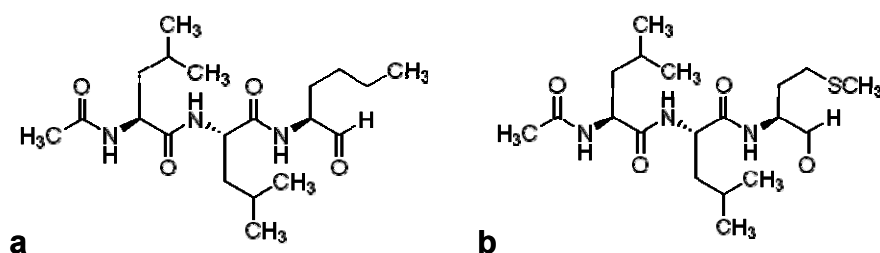


Abb. 8: Schematische Darstellung der verwendeten Calpaininhibitoren. (a) Calpaininhibitor I, (b) Calpaininhibitor II.

2.1.9.3 NF- κ B Inhibitor SN50

SN50 wurde von Biomol, Hamburg bezogen und in *Aqua dest* gelöst. Stammlösungen von SN50 wurden bei -20°C gelagert. SN50 ist ein zellpermeables Peptid, welches die Kernlokalisationssequenz der NF- κ B Untereinheit p50 trägt und den Kernimport des zellulären Transkriptionsfaktors NF- κ B hemmt.

2.1.10 Medien

Flüssigmedium für kd-HFF

		<u>1 l Ansatz</u>
	DMEM (Lonza)	886.8 ml
10% (v/v)	FKS	100 ml
2.4 mM	L-Glutamin	12 ml
10 mg/l	Gentamycinsulfat (Stammlösung 50 mg/ml)	0.2 ml
5 mg/l	Puromycin (Stammlösung 5 mg/ml)	1 ml

Flüssigmedium für HELF und RPE

		<u>1 l Ansatz</u>
	EMEM (Lonza)	959 ml
2% (v/v)	FKS	20 ml
50 mg/l	Gentamycinsulfat (Stammlösung 50 mg/ml)	1 ml
2 mM	L-Glutamin	10 ml
1x	Nicht-essentielle Aminosäuren	5 ml
1 mM	Natriumpyruvat	5 ml

Halbfestes Medium für HELF (Methocel)

		<u>1 l Ansatz</u>
	10x EMEM (Cambrex)	100 ml
	Methylzellulose (Stammlösung)	785 ml
0.2% (v/v)	NaHPO ₃ (Stammlösung 7.5%)	29 ml
2 mM	L-Glutamin	10 ml
7.5% (v/v)	FKS	75 ml
50 mg/l	Gentamycinsulfat (Stammlösung 50 mg/ml)	1 ml

Stammlösung Methylzellulose

	<u>1 l Ansatz</u>
Methylzellulose	5 g
L1 Stammlösung	5 ml
<i>Aqua dest</i>	<i>ad 1 l</i>

L1 Stammlösung

		<u>1 l Ansatz</u>
350 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O	51 g
200 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O	40 g
<i>Aqua dest</i>		<i>ad 1 l</i>

2.1.11 Puffer und Lösungen**2.1.11.1 Puffer und Lösungen für die Zellzucht****Trypsin/EDTA**

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
Na ₂ HPO ₄	0.56 mM
D(+)-Glucose	5 mM
Tris/HCl, pH 7.0	5 mM
EDTA in 0.25%iger Trypsin-Lösung	0.01% (v/v)
<i>Aqua dest</i>	

PBS₀ (Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne CaCl₂ und MgCl₂), pH 7.4

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
K ₂ HPO ₄	1.4 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
<i>Aqua dest</i>	

PBS

CaCl ₂	100 mM
MgCl ₂	100 mM
<i>PBS₀</i>	

2.1.11.2 Lösung für den Plaquereduktionsassay**Blocking-Lösung**

FKS	10% (v/v)
Tween-20	0.2% (v/v)
<i>PBS</i>	

2.1.11.3 Puffer für die Gewinnung von Zellextrakten**Solubilisierungspuffer (Stammlösung)**

Tris/HCl, pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P-40	1% (v/v)
NaN ₃	0.02% (w/v)
<i>Aqua dest</i>	

TEAD-Puffer

Tris/HCl, pH 7.5	20 mM
EDTA	1 mM
NaN ₃	1 mM
DTT	1 mM
<i>Aqua dest</i>	

2.1.11.4 Puffer für Western Blot-Analysen

4x SDS-PAGE-Probenpuffer

Tris/HCl, pH 6.8	200 mM
β-Mercaptoethanol	4% (v/v)
SDS	4% (w/v)
Glycerin	40% (v/v)
Bromphenolblau	0.01% (w/v)
<i>Aqua dest</i>	

10x SDS-PAGE-Puffer

Glycin	2 M
Tris	250 mM
SDS	1% (w/v)
<i>Aqua dest</i>	

Blotting-Puffer

Glycin	200 mM
Tris	25 mM
Ethanol	20% (v/v)
<i>Aqua dest</i>	

Reblotting-Puffer

SDS	1.8% (v/v)
Tris/HCl, pH 6.8	90 mM
β-Mercaptoethanol	0.64% (v/v)
<i>Aqua dest</i>	

2.1.11.5 Puffer für die Pulsfeldgelelektrophorese

Lysepuffer

L-Puffer + 1% (w/v) Na-Sarkosyl und 100 µg/ml Proteinase K

L-Puffer

Tris/HCl, pH 7.5	10 mM
NaCl	20 mM
EDTA	100 mM
<i>Aqua dest</i>	

TE 10/10-Puffer

Tris/HCl, pH 8.0	10 mM
EDTA	10 mM
PMSF	1 mM
<i>Aqua dest</i>	

TBE-Puffer (10x)

Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	10 mM
<i>Aqua dest</i>	

2.1.11.6 Puffer für die Bestimmung der Proteasomaktivität**Lysepuffer**

Tris/HCl, pH 7.5	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
NaCl	50 mM
Nonidet P-40	0.1% (v/v)
<i>Aqua dest</i>	

Assaypuffer

Tris/HCl, pH 7.5	20 mM
EDTA	1 mM
<i>Aqua dest</i>	

2.1.11.7 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

Epon

Lösung A:	Glycidether 100 (Epon)	20 ml
	Härter DBA	32 ml
Lösung B:	Glycidether 100 (Epon)	32 ml
	Härter MNA	28 ml

Beide Lösungen wurden 15 min gerührt, vermischt und anschließend wiederum 15 min gerührt. Nach Zugabe von 1.5% (v/v) Beschleuniger BDMA wurde die Lösung erneut 15 min gerührt. Epon wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.12 Sonstige Materialien

Beem-Kapseln®	Plano, Wetzlar
Deckgläschen (Durchmesser 12 mm)	MAGV, Rabenau-Londorf
Kupfernetze	Plano, Wetzlar
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Pipetten	Corning Costar, Schiphol-Rijk
Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Sigma-Aldrich, Steinheim
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen und -platten	Nunc, Wiesbaden

2.1.13 Geräte

Gerät / Bezeichnung	Hersteller
CCD-Kamera Image Station 4000MM	Kodak
Digitalkamera 2K MegaView2	Olympus Soft Imaging Solutions
Elektroblotter TE70X SemiDry Transfer Unit	Hoefer
Elektronenmikroskop Tecnai™ G2	FEI Company

ELISA-Reader Sunrise	Tecan
Fluoreszenzkamera Olympus Colorview II	Olympus
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50	Olympus
Fluorometer	BioTek Instruments
Laser Scanning-Mikroskop LSM 510/ConfoCor2	Carl Zeiss
Lichtmikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss
PFGE-Anlage Gene Navigator	Pharmacia Biotech
Spektrophotometer Ultrospec 4000	Pharmacia Biotech
Ultramikrotom ultracut S	Reichert-Jung
UV-Transilluminator BioDoc Analyze	Biometra

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

HELF der Passage 10 bis 20, kd-HFF der Passage 10 bis 25 und RPE der Passage 1 bis 6 wurden ausgehend von Gefrierstocks in handelsüblichen 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen bzw. 12 Well, 24 Well oder 96 Well Zellkulturplatten angezüchtet und passagiert. HELF und RPE wurden in EMEM (siehe Abschnitt 2.1.10) kultiviert. Kd-HFF wurden in DMEM (siehe Abschnitt 2.1.10) angezüchtet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 37°C und 5%iger CO₂-Begasung.

Zur Passagierung wurden die konfluent gewachsenen Monolayer nach Entfernung des Mediums zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit auf 37°C erwärmter Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden im Verhältnis 1:2 (kd-HFF) bzw. 1:3 (HELF, RPE) in neue Zellkulturflaschen mit entsprechendem Kulturmedium ausgesät.

2.2.1.2 Experimentelle HCMV-Infektion

Konfluente HELF und kd-HFF wurden mit dem HCMV Laborstamm AD169 mit unterschiedlicher MOI infiziert (wie angegeben). Vor Zugabe der Virussuspension wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die entsprechende Menge an Virussuspension in EMEM bzw. DMEM ohne Zusatz von FKS auf die Zellen gegeben und die Kulturen für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das zur Infektion eingesetzte Volumen betrug 0.1 ml für 24 Well Zellkulturplatten, 0.2 ml für 12 Well Zellkulturplatten, 1 ml für 25 cm² Zellkulturflaschen, 2 ml für 75 cm² Zellkulturflaschen und 5 ml für 175 cm² Zellkulturflaschen. Nach Ende der Adsorptionszeit wurde der Überstand mit den nicht-adsorbierten Viruspartikeln durch 1 ml (24 Well Zellkulturplatten), 2 ml (12 Well Zellkulturplatten), 5 ml (25 cm² Zellkulturflaschen), 15 ml (75 cm² Zellkulturflaschen) oder 40 ml (175 cm² Zellkulturflaschen) EMEM 2% (v/v) FKS bzw. DMEM 10% (v/v) FKS ersetzt.

2.2.1.3 Experimentelle VZV-Infektion

In 25 cm² Zellkulturflaschen gewachsene HELF (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) wurden mit dem VZV Impfstamm Oka bzw. dem VZV Wildtypisolat JoSt mit unterschiedlicher MOI infiziert (wie angegeben). Vor Zugabe der VZV-infizierten Zellsuspension wurde zunächst das Kulturmedium entfernt. Anschließend wurde die entsprechende Menge an VZV-infizierter Zellsuspension in EMEM ohne Zusatz von FKS auf die Zellen gegeben und die Kulturen für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ende der Adsorptionszeit wurde der Überstand mit den nicht-adsorbierten Viruspartikeln durch 5 ml EMEM 2% (v/v) FKS ersetzt.

2.2.1.4 Anzucht und Titerbestimmung von HCMV

Für die Anzucht des HCMV Laborstammes AD169 wurden konfluent gewachsene HELF in 175 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 2x10⁷/Flasche) mit einer MOI von 0.1 infiziert. Das Kulturmedium wurde erneuert, sobald 50%

der Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten (ca. 5-6 Tage nach Infektion). Nach 10 Tagen wurde das virushaltige Medium abgenommen. Noch vorhandene Zellbestandteile wurden durch Sedimentation (2.500 x g, 5 min, 4°C) abgetrennt. Die zellfreie Virussuspension wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Bestimmung des Titors wurde zunächst eine geometrische Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-6}) der Virussuspension in Kulturmedium hergestellt. Die Quantifizierung der infektiösen Einheiten (PFU) in jeweils 0.1 ml der einzelnen Verdünnungsstufen erfolgte in 12 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 5×10^5 /Well) mittels Plaquereduktionsassay (siehe Abschnitt 2.2.1.6). Der Titer der Stammsuspension (PFU/ml) ergibt sich aus der Anzahl der Plaques (n) der höchsten noch positiven Verdünnungsstufe (10^{-x}) nach der Formel:

$$PFU / ml = n \times 10^{x+1}$$

2.2.1.5 Titerbestimmung von VZV

Zur Bestimmung des Virustiters wurden die infizierten Zellen zunächst mit auf 37°C erwärmter Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1×10^6 /Flasche) abgelöst. Anschließend wurde eine geometrische Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-8}) der Zellsuspension in Kulturmedium hergestellt. Zur Quantifizierung der infektiösen Einheiten (PFU) der einzelnen Verdünnungsstufen wurden HELF in 96 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 5×10^4 /Well) mit 50 µl Zellsuspension pro Well infiziert. Pro Verdünnungsstufe wurden acht Parallelansätze angesetzt. Nach ca. 4-7 Tagen zeigten die infizierten Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE), der unter dem Lichtmikroskop erkennbar war.

Zunächst wurde die TCID₅₀ (*median tissue culture infective dose*) anhand der Reed-Münch-Formel berechnet. Die Reed-Münch-Formel berücksichtigt den akkumulierten Prozentsatz von Wells, die einen CPE aufweisen:

$$TCID_{50} = \left| \log V_{>50\%} \right| + \frac{(\% \text{ pos. Wells bei } V_{>50\%}) - 50\%}{(\% \text{ pos. Wells bei } V_{>50\%}) - (\% \text{ pos. Wells unter } V_{>50\%})}$$

$V_{>50\%}$ = höchste Verdünnung, bei welcher > 50% der Wells einen CPE aufweisen

Der Titer der Stammsuspension (PFU/ml) wird aus der $TCID_{50}$ nach der Formel $10^{TCID_{50}} / 0.05 \text{ ml}$ bzw. $10^{TCID_{50}} \times 20 / \text{ml}$ ermittelt.

2.2.1.6 Plaquereduktionsassay

In 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) oder 12 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 5x10⁵/Well) gewachsene HELF wurden mit HCMV AD169 mit einer MOI von 0.001 infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 1 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Methocel (siehe Abschnitt 2.1.10) überschichtet. Das halbfeste Medium gestattet die Virusausbreitung von Zelle zu Zelle, so dass es zur Bildung von Plaques kommt. Sieben Tage nach Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einem Ethanol/Aceton-Gemisch (95:5) für 30 min bei –20°C fixiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit Blocking-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem gegen HCMV IE1 gerichteten Primärantikörper mAb p63-27 für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 5x mit PBS gewaschen und für 2 h mit einem HRP-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörper bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS wurden die infizierten Zellen mit Hilfe des AEC Staining Kits den Angaben des Herstellers folgend durch eine Farbreaktion visualisiert. Die Kerne der HCMV-infizierten Zellen zeigten nach einer Einwirkzeit von 30 min eine Rotfärbung, so dass die Anzahl der PFU mit Hilfe eines Lichtmikroskops quantifiziert werden konnte.

2.2.1.7 Transiente Transfektion

Das Einbringen von Plasmid-DNA in RPE-Zellen erfolgte mittels SuperFect[®] Transfektionsreagenz gemäß den Angaben des Herstellers. RPE-Zellen wurden auf Deckgläschen in 12 Well Zellkulturplatten bis zu einer Konfluenz von 60-80% (Zellzahl: 3x10⁵-4x10⁵/Well) kultiviert. Zur transienten

Transfektion wurden pro Well 3 µg des Plasmids pG305 (siehe Abschnitt 2.1.4) in 75 µl EMEM (ohne Serum und Antibiotika) eingesetzt. Diesem Ansatz wurden pro Well 7.5 µl SuperFect® Transfektionsreagenz hinzugefügt. Zur Ausbildung der Transfektionskomplexe wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den 12 Well Zellkulturplatten entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 400 µl EMEM (mit Serum und Antibiotika) pro Well wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben (insgesamt 482.5 µl pro Well) und die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Transfektionskomplexe durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit 1 ml EMEM (mit Serum und Antibiotika) für weitere 48 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8 Zytotoxizitätsbestimmung (XTT Assay)

Die zytotoxische Wirkung von Proteasominhibitoren auf HELF, kd-HFF und RPE-Zellen wurde mit Hilfe des Cell Proliferation Kit II in 96 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 5×10^4 /Well) bestimmt. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die konfluent gewachsenen Monolayer mit verschiedenen Konzentrationsstufen von MG132, MG262, BSc2118 oder Lactacystin in 100 µl Kulturmedium pro Well bei 37°C inkubiert. Pro Konzentrationsstufe wurden acht Parallelansätze angesetzt. Nach 72 h wurden 50 µl der XTT-Reaktionslösung (Mischung aus XTT und Elektronenkoppelndem Reagenz im Verhältnis 50:1) pro Well zugegeben (Endkonzentration XTT 0.3 mg/ml). Nach einer weiteren Inkubation der Zellkulturplatten für 4 h bei 37°C wurde die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes XTT zum orangenen Farbstoff Formazan, die nur in lebenden Zellen stattfindet, bei 492 nm spektrophotometrisch mittels ELISA-Plattenreader (Sunrise, Tecan) quantifiziert (Referenzwellenlänge 650 nm).

2.2.1.9 Gewinnung von Zellextrakten

Zur Gewinnung von Zellextrakten wurden die Zellkulturen zunächst dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem Abschaben vom Flaschenboden wurden die Zellen sedimentiert ($2.500 \times g$, 10 min). Die Zellen wurden in 1 ml

PBS resuspendiert und erneut sedimentiert (10.000 x g, 2x à 30 s). Anschließend wurden die Zellen in 80-120 µl Solubilisierungspuffer aufgeschlossen. Um eine Degradation der Proteine zu verhindern, wurde der Solubilisierungspuffer kurz vor Gebrauch mit Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Menge nach Vorgaben des Herstellers) versetzt. Nach Inkubation der Proben für 30 min bei 4°C im Schüttler wurden die Zelltrümmer durch Sedimentation (20.000 x g, 30 min, 4°C) abgetrennt. Die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.10 Gewinnung von Proteasom-Rohextrakten

In 75 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁷/Flasche) kultivierte HELF wurden zunächst dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem Abschaben vom Flaschenboden wurden die Zellen sedimentiert (2.500 x g, 10 min). Die Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und erneut sedimentiert (10.000 x g, 2x à 30 s). Anschließend wurden die Zellen in TEAD-Puffer mit 0.1% (v/v) Triton X-100 aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Frieren/Tauen (ca. 3-5x abwechselnde Inkubation der Zellen in flüssigem Stickstoff bzw. bei 37°C im Heizblock). Zelltrümmer wurden durch Sedimentation (20.000 x g, 30 min, 4°C) abgetrennt. Die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung

Der Proteingehalt von Zellextrakten wurde nach der Methode von Bradford bestimmt [Bradford, 1976]. Die Eichkurve wurde anhand einer Konzentrationsreihe von BSA (30, 70, 100, 150 und 200 µg/ml in 100 µl PBS) erstellt, wobei die einzelnen Konzentrationsstufen mit jeweils 900 µl Bradford-Reagenz versetzt wurden. Um den linearen Messbereich einzuhalten, wurden die Zelllysate im Verhältnis 1:100 in PBS verdünnt und anschließend ebenfalls mit 900 µl Bradford-Lösung versetzt. Nach 20 min wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen Leerwert (100 µl PBS in 900 µl Bradford-Lösung)

photometrisch bestimmt. Der Proteingehalt der Proben wurde anhand der erstellten Eichkurve mit Hilfe der SWIFT Protein Quantification Software berechnet.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli [Laemmli, 1970].

Die Glasplatten für das Polyacrylamidgel wurden mit Hilfe von 1 mm Abstandshaltern zusammengesetzt. Das 10%ige (v/v) Trenngel wurde unmittelbar nach Induktion der Polymerisationsreaktion durch Zugabe von 10% (v/v) APS und 0.1% (v/v) TEMED bis 1 cm unter den Kamm gegossen und mit *Aqua dest* überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit dem 3.75%igen (v/v) Sammelgel überschichtet. Anschließend wurde der Kamm eingesetzt. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit 4x Probenpuffer versetzt und die Proteine für 5 min bei 96°C denaturiert. Zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde ein Größenstandard mitgeführt (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder). Um die Bildung einer einheitlichen Lauffront der Proteine im Sammelgel zu gewährleisten, erfolgte die Elektrophorese zunächst bei 15 mA in 1x SDS-PAGE-Puffer. Nach Einlaufen der Proben in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht.

Sammelgel

Rotiphorese® Gel 30	3.75% (v/v)
Tris/HCl, pH 6.8	125 mM
SDS	0.1% (w/v)
APS	0.04% (v/v)
TEMED	0.1% (v/v)
<i>Aqua dest</i>	

Trenngel

Rotiphorese® Gel 30	10% (v/v)
Tris/HCl, pH 8.8	370 mM
Glycerin	5% (v/v)
SDS	0.1% (w/v)
APS	0.1% (v/v)
TEMED	0.1% (v/v)
<i>Aqua dest</i>	

2.2.2.3 Immunoblot

Proteine aus Zelllysaten (siehe Abschnitt 2.2.1.9) können nach Auftrennung über SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.2.2) mittels Immunoblot nachgewiesen werden. Dabei werden die auf eine Membran (z.B. aus Nitrozellulose oder PVDF) transferierten Proteine spezifisch über Antigen-Antikörper-Reaktionen detektiert.

Zunächst wurde die Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran für 15 min bei Raumtemperatur in Blotting-Puffer bzw. Methanol inkubiert. Zum Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran (0.2 µm Porengröße) wurde das SemiDryBlot-Verfahren angewendet. Dazu wurden drei in Blotting-Puffer getränkte Filterpapiere, die Membran, das Gel und drei weitere Filterpapiere zwischen zwei Plattenelektroden aufeinander geschichtet. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer Stromstärke von 0.8 mA/cm² Blotfläche über einen Zeitraum von 90 min. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS/0.1% (v/v) Tween-20 für 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen der Membran in PBS/0.1% (v/v) Tween-20 à 5 min erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Zur Entfernung überschüssiger, ungebundener Immunglobuline wurde die Membran 3x à 5 min in PBS/0.1% (v/v) Tween-20 gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 90 min mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (in PBS/0.1% (v/v) Tween-20) inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran erfolgte der Nachweis der spezifisch detektierten Proteine durch die

Zugabe von SuperSignal West Dura ECL-Reagenz. Bei der ECL-Reaktion (*enhanced chemoluminescence*) katalysiert die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase die Oxidation von Luminol und erzeugt auf diese Weise ein Chemolumineszenzsignal. Das entstehende Lichtsignal wurde mittels CCD-Kamera (Kodak 4000 MM) unter Verwendung der Kodak Molecular Imaging Software dokumentiert.

Durch Inkubation der Membran in Reblotting-Puffer für 20 min bei 65°C im Wasserbad wurde die Antigen-Antikörper-Bindung wieder gelöst. Die Membran konnte somit nach erneutem Absättigen mit Milchpulver zur Detektion weiterer Proteine verwendet werden.

2.2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde zum Nachweis viraler Proteine in transfizierten oder infizierten Zellen durchgeführt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz erfolgt der Proteinnachweis über einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der gegen den spezifischen, nicht-markierten Primärantikörper gerichtet ist. Die Immunfluoreszenzfärbung gibt zudem Aufschluss über die subzelluläre Lokalisation von Proteinen.

Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Bei der Immunfluoreszenz erfolgte die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd, da bei dieser Methode sowohl die morphologische Struktur der Zelle als auch die Antigenität weitgehend erhalten bleiben. Die Paraformaldehyd-Fixierung erfordert zusätzlich die Permeabilisierung der Zellmembran durch nicht-ionische Detergenzien, um die Bindung der Antikörper an intrazelluläre Antigene zu ermöglichen.

Deckglaskulturen in 24 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 1×10^5 /Well) oder 12 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 5×10^5 /Well) wurden mit 3% (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 20 min fixiert und danach mit PBS gewaschen. Zur Neutralisierung der freien Aldehydgruppen wurden die Zellen für 10 min mit 50 mM NH_4Cl (in PBS) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Schließlich wurden die Zellen für 5 min mit 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert und erneut gewaschen.

Immunfluoreszenzfärbung permeabilisierter Zellen

Fixierte Deckglaskulturen wurden mit dem Primärantikörper für 60 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Primärantikörper wurde gegebenenfalls mit 3% (w/v) BSA in PBS verdünnt (siehe Abschnitt 2.1.7). Im Anschluss wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Darauf folgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (in 3% (w/v) BSA) für 30 min ohne Lichteinwirkung. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde zusätzlich der DNA-Farbstoff DAPI (1 µg/ml) zugegeben. Die Präparate wurden anschließend mit PBS und *Aqua dest* gewaschen, um die Ausbildung von Salzkristallen zu verhindern. Die Deckgläschen wurden in FluoprepTM mit 2.5% (w/v) DABCO auf Objektträgern fixiert, getrocknet und anschließend mit Hilfe eines konfokalen Carl Zeiss LSM 510/ConfoCor2 Laser Scanning Mikroskops oder eines Olympus BX 50 Fluoreszenzmikroskops analysiert. Die Proben wurden mittels Olympus Colorview II Kamera in Verbindung mit der Cell D Software (Fluoreszenzmikroskop) bzw. mittels Digitalkamera in Verbindung mit der LSM510 Meta Software (konfokales Laser Scanning Mikroskop) fotografiert.

2.2.2.5 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Pulsfeldgelelektrophorese erlaubt die Auftrennung großer DNA-Fragmente wie z.B. viraler DNA über das Anlegen von elektrischen Impulsen in einem Winkel von je 60° zur Laufrichtung.

Zur Isolierung viraler DNA aus HCMV-infizierten HELF wurden die Zellen zunächst vom Boden der Zellkulturgefäße (25 cm² Zellkulturflaschen, Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) abgeschabt, sedimentiert (2.500 x g, 5 min), mit PBS gewaschen und erneut sedimentiert (10.000 x g, 5 min). Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl L-Puffer aufgenommen, mit 100 µl 2% (w/v) LMP-Agarose sowie 10 mg/ml Proteinase K versetzt und in Blockform abgekühlt. Zum Aufschluss der Zellen wurden die Blöckchen in 1 ml Lysepuffer versetzt

mit 100 µg/ml Proteinase K bei 50°C inkubiert. Der Puffer wurde nach 3 h erneuert und die Lyse über Nacht fortgesetzt. Anschließend wurde der Lysepuffer erneut gewechselt. Nach ca. 5 h wurde der Lysepuffer abgenommen. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Blöckchen in TE 10/10-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der TE 10/10-Puffer gewechselt und die Blöckchen erneut über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Gelblöcke zweimal für 30 min in 0.5x TBE-Puffer äquilibriert und in ein 1%iges (w/v) LMP-Agarosegel eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte in 0.5x TBE für 27 h bei 14°C mit einem Pulswinkel von 120° und einer Pulszeit von 15-110 s bei 150 V/cm. Im Anschluss wurde das Gel für 1 h mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die angefärbte DNA wurde mittels UV-Transilluminator (BioDoc Analyze, Biometra) visualisiert und fotografiert. Die Größe der HCMV-Monomere (240 kb) wurde mittels Lambda Ladder PFG Marker bestimmt.

2.2.2.6 Elektronenmikroskopie

HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) wurden in 4 ml 20 mM HEPES pH 7.4 mit 2.5% (v/v) Glutaraldehyd geerntet, 90 min fixiert und anschließend sedimentiert (2.500 x g, 15 min). Nach dreimaligem Waschen mit *Aqua dest* (2.500 x g, 5 min) und Nachfixierung mit 500 µl 1% (v/v) Osmiumtetroxid in *Aqua dest* für 1 h wurden die Zellen erneut mit *Aqua dest* gewaschen (20.000 x g, 2x à 5 min). Zur verbesserten Kontrastierung der Membranen wurden die Zellen für 1 h mit 1 ml 0.1% (w/v) Tannin (in HEPES pH 7.4) inkubiert. Die anschließende Inkubation mit 1% (w/v) Natriumsulfat (in HEPES pH 7.4) für 2x 10 min diente zum Entwässern der Proben. Nach weiterer Dehydrierung mit 50% Ethanol für 3x 5 min wurden die Zellen für 30 min mit 0.2% (w/v) Uranylacetat in 70% Ethanol gefärbt, gefolgt von Dehydrierungsschritten mit 90% bzw. 100% Ethanol für je 3x 10 min und 100% Propylenoxid für 2x 20 min. Im Anschluss wurden die Zellen für 1 h in 33% und nachfolgend 66% Epon (siehe Abschnitt 2.1.11.7) in Propylenoxid inkubiert und schließlich in 100% Epon in Beem-Kapseln[®] (Polyethylen-Kapseln mit pyramidenförmiger Spitze) eingebettet. Zur Polymerisation wurden die Proben für 72 h bei 60°C inkubiert. Die

Herstellung von Ultradünnschnitten erfolgte mit einem Ultramikrotom. Die Schnitte wurden auf mit Pioloform beschichtete Kupfernetze übertragen und für 10 min mit 1% (w/v) Uranylacetat in 40% Ethanol sowie für 10 min mit Bleizitrat zur Kontrastierung angefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse mit einem TecnaiTM G2 Elektronenmikroskop bei einer konstanten Spannung von 120 kV. Die Aufnahme von Mikrographen erfolgte mit Hilfe einer 2K MegaView2-Digitalkamera bei kalibrierten Vergrößerungen.

2.2.2.7 Bestimmung der CT-L Proteasomaktivität

HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) wurden mittels Zellschaber geerntet und in 120 µl Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.11.6) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellfragmente sedimentiert (2.500 x g, 20 min, 4°C). Um die Degradation der Proteasomen zu verhindern, wurde der Überstand mit Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (nach Angaben des Herstellers) behandelt. Die Chymotrypsin-ähnliche (CT-L) Aktivität des Proteasoms wurde anhand der Umsetzung des fluorogenen Substrats Suc-LLVY-AMC bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellextrakt für 30 min in 100 µl Assaypuffer zusammen mit 50 µM Substrat bei 37°C inkubiert. Das freigesetzte AMC wurde durch Fluoreszenzemission bei 460 nm (Anregung bei 390 nm) mittels Fluorometer detektiert und mit Hilfe der KC4 Software (BioTek Instruments, Vermont) ausgewertet. Die Menge an umgesetztem Substrat wurde anhand von Eichkurven, die mit reinem AMC erstellt wurden (0, 0.1, 1, 10, 100 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 nM AMC), ermittelt. Die Proteasomaktivität wurde als nM freigesetztes AMC / 30 min / µg Protein berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von HCMV auf die Proteasomaktivität

3.1.1 CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF

Um zunächst den Einfluss von HCMV auf die Proteasomaktivität zu untersuchen, wurden nichtinfizierte (mock) oder mit dem Laborstamm AD169 infizierte (MOI 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 oder 2) HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) mit 0.5 µM MG132 oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert. Die Zellen wurden 72 h p.i. zur Bestimmung der Proteasomaktivität geerntet (siehe Abschnitt 2.2.2.7). Die Versuche beschränkten sich auf die Bestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen (CT-L) Proteasomaktivität, da diese als einzige der drei katalytischen Aktivitäten des Proteasoms in Zelllysaten detektiert werden kann. Die CT-L Proteasomaktivität wurde mit Hilfe eines Fluorometers unter Verwendung der KC4 Software (BioTek Instruments) gemessen.

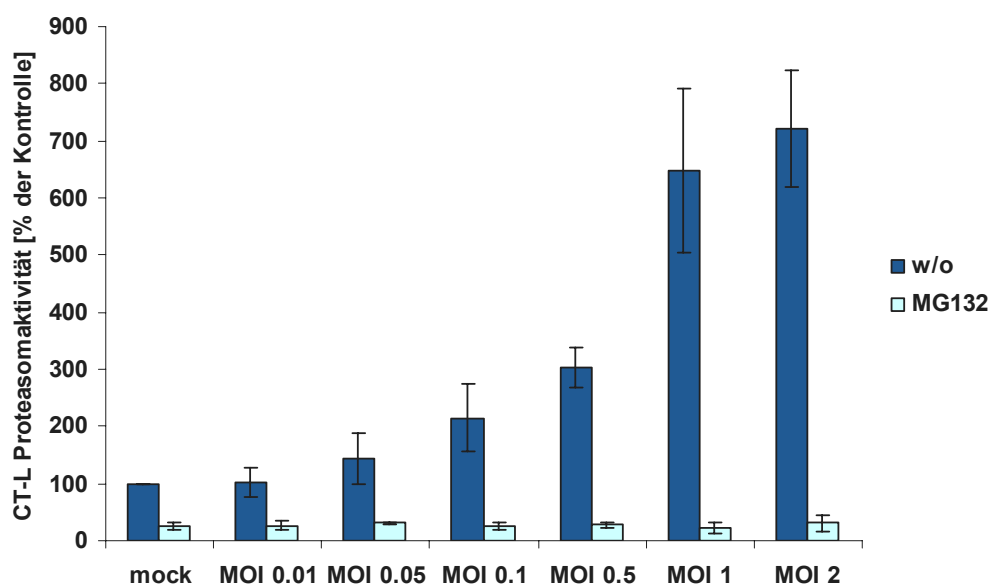


Abb. 9: Einfluss von HCMV auf die CT-L Proteasomaktivität in HELF. Nichtinfizierte (mock) oder mit HCMV AD169 infizierte HELF (MOI 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 oder 2) wurden mit 0.5 µM MG132 oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) behandelt. Die CT-L Proteasomaktivität wurde 72 h p.i. in Zellextrakten gemessen. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die nichtinfizierte, Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten.

In Abhängigkeit von der MOI war die CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF gegenüber der nichtinfizierten Kontrolle bis zu siebenfach erhöht (siehe Abb. 9, MOI 2). In Anwesenheit von 0.5 μ M MG132 war die CT-L Proteasomaktivität gegenüber der Kontrolle um durchschnittlich 70-80% reduziert. Diese Reduktion war unabhängig von der eingesetzten MOI. Die teilweise hohe Standardabweichung der Proteasomaktivität könnte auf der Verwendung unterschiedlich häufig passagierter HELF beruhen.

3.1.2 CT-L Proteasomaktivität in HELF nach Infektion mit UV-inaktiviertem HCMV

Die Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF könnte einerseits „aktiv“ vom Virus induziert werden, andererseits jedoch auch auf der „passiven“ Induktion des Immunproteasoms beruhen, für welches eine gesteigerte CT-L Aktivität im Vergleich zum konstitutiven Proteasom beschrieben ist (siehe Abschnitt 1.5.2). Bei der Adsorption von HCMV an die Wirtszelle wird das Virus durch den *Toll-like receptor 2* erkannt, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird, die zur Synthese von Interferon- α und - β führt [Botero, 2008; Juckem, 2008]. Da Shin *et al.* kürzlich zeigen konnten, dass auch Typ I-Interferone den Wechsel vom konstitutiven Proteasom zum Immunproteasom auslösen können [Shin, 2006], wäre es möglich, dass es sich bei der beobachteten Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität lediglich um die Folge einer zellulären Abwehrreaktion handelt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden Versuche mit UV-inaktiviertem HCMV durchgeführt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht wird das virale Genom irreparabel geschädigt, so dass die Expression der viralen Gene nicht mehr stattfinden kann. Adsorption und Viruseintritt laufen jedoch unabhängig von der viralen Genexpression ab und finden daher auch nach der UV-Inaktivierung statt.

Für den Versuch wurden HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) mit dem Laborstamm AD169 bzw. mit UV-inaktiviertem AD169 (Dosis: 7 J/cm²) mit einer MOI von 1 infiziert. Nichtinfizierte HELF (mock) dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden 72 h p.i. zur Bestimmung der CT-L

Proteasomaktivität geerntet (siehe Abschnitt 2.2.2.7). Die Messung der CT-L Proteasomaktivität erfolgte mit Hilfe eines Fluorometers unter Verwendung der KC4 Software (BioTek Instruments).

Die Wirksamkeit der UV-Inaktivierung wurde anhand einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.2.2.4) von nichtinfizierten (mock) oder HCMV-infizierten (MOI 1) Deckglaskulturen von HELF unter Verwendung eines Primärantikörpers gegen das virale Protein IE1 und anti-Maus Cy3-konjugierten F(ab')₂ Fragmenten als Sekundärantikörper überprüft (siehe Abb. 10 B). Die Dokumentation der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und einer Digitalkamera in Verbindung mit der Cell D Software (Olympus).

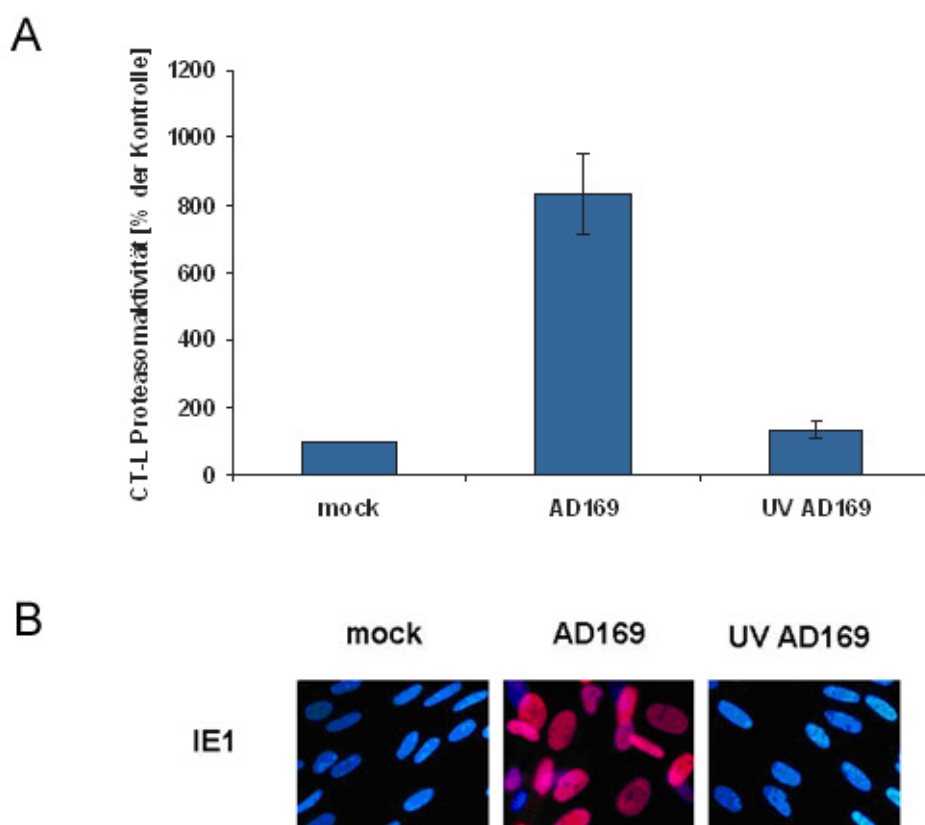


Abb. 10: Einfluss von UV-inaktiviertem HCMV auf die CT-L Proteasomaktivität in HELF. HELF wurden nicht infiziert (mock) bzw. mit HCMV AD169 oder UV-inaktiviertem AD169 (Dosis: 7 J/cm²) mit einer MOI von 1 infiziert. **(A)** Die CT-L Proteasomaktivität wurde 72 h p.i. in Zelllysaten bestimmt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die nichtinfizierte Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Die UV-Inaktivierung des Virus wurde mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gegen das virale Protein IE1 (mAb p63-27) überprüft. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen.

Die CT-L Proteasomaktivität in HELF, die mit unbehandeltem Virus infiziert wurden, war gegenüber der nichtinfizierten Kontrolle ca. achtfach erhöht (siehe Abb. 10 A). Im Gegensatz dazu war die CT-L Aktivität in HELF, die mit UV-inaktiviertem Virus infiziert wurden, lediglich um 30% gegenüber der nichtinfizierten Kontrolle erhöht.

Dieses Experiment zeigte, dass Adsorption und Eintritt des Virus allein keine signifikante Steigerung der CT-L Proteasomaktivität auslösen, sondern dass vielmehr die Expression viraler Proteine dafür nötig ist. Es ist daher nicht anzunehmen, dass die Erhöhung der Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF auf der Induktion des Immunproteasoms beruht und es sich bei dem beobachteten Effekt lediglich um einen Aspekt der antiviralen Immunantwort der Wirtszelle handelt.

3.1.3 Zusammensetzung des Proteasoms in HCMV-infizierten HELF

Um weiter aufzuklären, ob die Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität auf der Induktion des Immunproteasoms beruht, wurde die Zusammensetzung des Proteasoms in HCMV-infizierten HELF mittels Western Blot analysiert.

Nichtinfizierte oder mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 1 infizierte HELF in 75 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1×10^7 /Flasche) wurden 24, 48 oder 72 h p.i. für eine Auftrennung der Zellextrakte durch SDS-PAGE geerntet (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Für die Western Blot-Analysen (siehe Abschnitt 0) wurden Primärantikörper gegen die Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms ($\beta 5$ /MB1, $\beta 1$ /delta) bzw. gegen die korrespondierenden Untereinheiten des Immunproteasoms ($\beta 5i$ /LMP7, $\beta 1i$ /LMP2) sowie die entsprechenden anti-Maus IgG ($\beta 5$ /MB1) bzw. anti-Kaninchen IgG ($\beta 1$ /delta, $\beta 5i$ /LMP7, $\beta 1i$ /LMP2) HRP-konjugierten Sekundärantikörper eingesetzt. Gereinigte 20S Proteasomen aus humanen Erythrozyten dienten als Positivkontrolle für die Expression der Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms, während gereinigte 20S Proteasomen aus Splenozyten als Positivkontrolle für die Expression der Untereinheiten des Immunproteasoms eingesetzt wurden.

Das Auftragen einheitlicher Proteinmengen wurde durch Abgleich der Menge der invarianten Proteasomuntereinheit alpha 4 gewährleistet. Zum Nachweis der HCMV-Infektion wurde ein Immunoblot mit einem Primärantikörper gegen die viralen Proteine IE1/2 und einem anti-Maus IgG HRP-konjugierten Sekundärantikörper durchgeführt. Die angefärbten Proteine wurden mittels CCD-Kamera detektiert und unter Verwendung der Kodak Molecular Imaging Software dokumentiert.

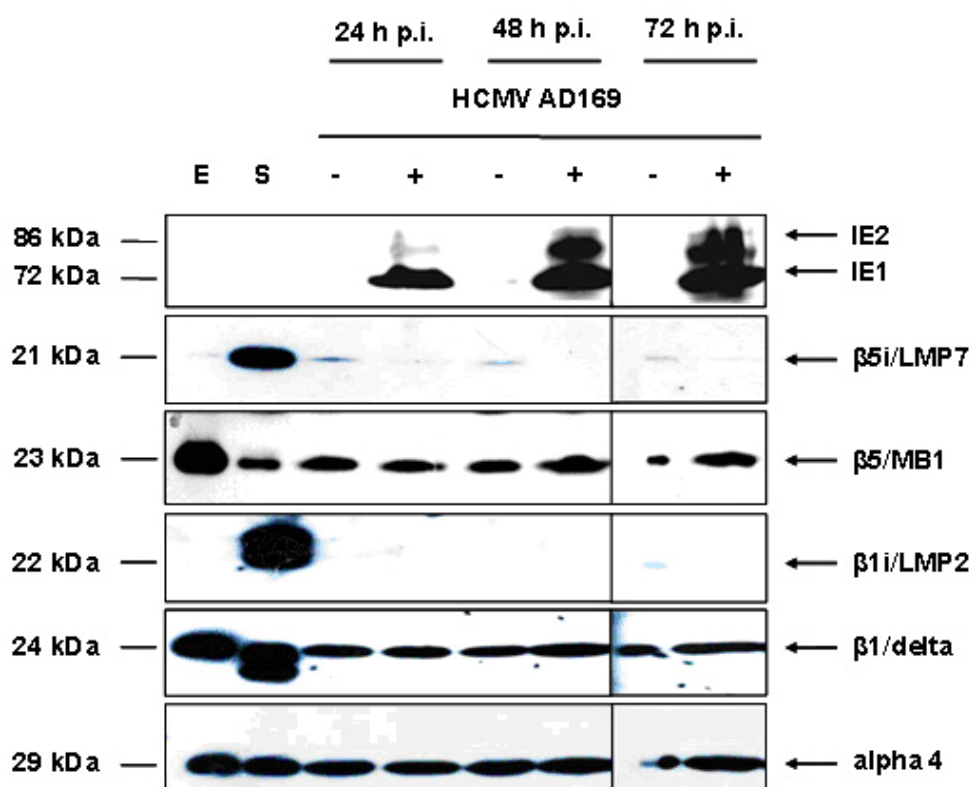


Abb. 11: Zusammensetzung des Proteasoms in HCMV-infizierten HELF. Nichtinfizierte oder HCMV AD169 infizierte HELF (MOI 1) wurden 24, 48 bzw. 72 h p.i. für die Gewinnung von Zellextrakten geerntet. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und Transfer auf PVDF-Membranen erfolgte der Nachweis der HCMV-Proteine IE1/2 sowie der Proteasomuntereinheiten $\beta 5i/LMP7$, $\beta 1i/LMP2$, $\beta 5/MB1$ und $\beta 1/delta$. Das Auftragen einheitlicher Proteinmengen wurde durch Abgleich der Menge der invarianten Proteasomuntereinheit alpha 4 gewährleistet. Aufgereinigte 20S Proteasomen aus humanen Erythrozyten (E) dienen als Positivkontrolle für die Expression der Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms. Aufgereinigte 20S Proteasomen aus humanen Splenozyten (S) dienen als Positivkontrolle für die Expression der Untereinheiten des Immunproteasoms. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen.

Die Western Blot-Analysen ergaben, dass die Immunproteasomuntereinheiten $\beta 5i/LMP7$ und $\beta 1i/LMP2$ zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in HCMV-infizierten HELF exprimiert werden (siehe Abb. 11). In nichtinfizierten HELF

war hingegen eine schwache Expression von $\beta 5i/LMP7$ (24, 48 und 72 h p.i.) sowie $\beta 1i/LMP2$ (72 h p.i.) zu beobachten. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Zellen Stress ausgesetzt waren (beispielsweise durch zu hohe Zelldichte), wodurch die Expression von Untereinheiten des Immunproteasoms ebenfalls ausgelöst werden kann [Callahan, 2006; Fuertes, 2003]. Im Hinblick auf die Expression der konstitutiven Untereinheiten $\beta 5/MB1$ und $\beta 1/delta$ war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Unterschied zwischen nichtinfizierten und HCMV-infizierten HELF feststellbar.

Das Experiment zeigte, dass die Induktion des Immunproteasoms in HCMV-infizierten HELF unterdrückt ist. Im Einklang mit den unter 3.1.2 erhaltenen Ergebnissen lässt sich somit schlussfolgern, dass die Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität in infizierten HELF nicht auf der Induktion des Immunproteasoms beruht.

3.1.4 Kinetik der CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF

Zur näheren Charakterisierung des Anstiegs der CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF wurde eine Kinetik über den Verlauf des viralen Replikationszyklus erstellt. Dazu wurden HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1×10^6 /Flasche) mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 oder 2 infiziert. Nichtinfizierte HELF dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden direkt nach der Adsorption (Zeitpunkt 0 h p.i.) bzw. 6, 24, 48, 72 und 96 h p.i. zur Bestimmung der CT-L Proteasomaktivität geerntet (siehe Abschnitt 2.2.2.7). Die Messung der CT-L Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Fluorometers unter Verwendung der KC4 Software (BioTek Instruments).

Aus Abbildung 12 wird ersichtlich, dass die CT-L Proteasomaktivität im Verlauf des Replikationszyklus anstieg. Im Einklang mit den unter 3.1.1 erhaltenen Ergebnissen hing das Ausmaß der Induktion von der eingesetzten MOI ab. Im Gegensatz dazu stellte sich der zeitliche Verlauf der Induktion MOI-unabhängig dar. Die CT-L Proteasomaktivität war bei allen untersuchten MOIs ab 24 h p.i. im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle erhöht und stieg

bis 72 h p.i. weiter an. Danach sank die Proteasomaktivität bei allen untersuchten MOIs um durchschnittlich 18% im Vergleich zum Maximalwert (Zeitpunkt 72 h p.i.).

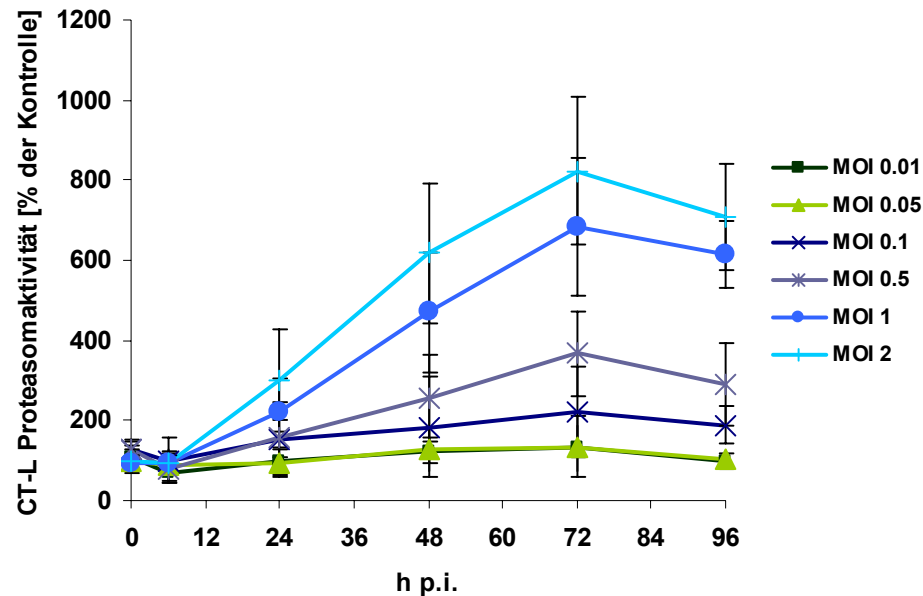


Abb. 12: Kinetik der CT-L Proteasomaktivität im Verlauf des viralen Replikationszyklus. Nichtinfizierte oder mit HCMV AD169 infizierte HELF (MOI 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 oder 2) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6, 24, 48, 72 und 96 h p.i.) zur Bestimmung der CT-L Proteasomaktivität in Zellextrakten geerntet. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die nichtinfizierte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunkts aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Diese Versuche deuteten darauf hin, dass die HCMV-vermittelte Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität bereits in der sehr frühen oder frühen Phase des Replikationszyklus induziert wird. Die Kinetik der Proteasomaktivität allein gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, welche virale Proteinklasse (IE, E oder L) maßgeblich an der Induktion beteiligt ist.

3.1.5 Zeitliche Abhängigkeit der Induktion der CT-L Proteasomaktivität

Um einen ersten Hinweis auf die Frage zu erhalten, welche virale Proteinklasse für die Induktion der CT-L Proteasomaktivität verantwortlich ist, sollte die Expression der sehr frühen, frühen bzw. späten Proteine selektiv

inhibiert werden. Da HCMV sich der zellulären Proteinbiosynthese-Maschinerie zur Expression der viralen Proteine bedient, sollte diese durch die zeitlich versetzte Zugabe des Translationsinhibitors Cycloheximid kontrolliert gehemmt werden („*time of addition*“-Analyse).

Für den Versuch wurden nichtinfizierte (mock) oder mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 1 infizierte HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) eingesetzt. Die Zugabe von 25 µg/ml Cycloheximid erfolgte 0, 3, 6, 12, 24, 36 oder 48 h p.i.. Als Kontrolle dienten nichtinfizierte HELF, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert wurden. Die Zellen wurden 72 h p.i. zur Bestimmung der CT-L Proteasomaktivität geerntet (siehe Abschnitt 2.2.2.7). Die Messung der CT-L Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Fluorometers unter Verwendung der KC4 Software (BioTek Instruments).

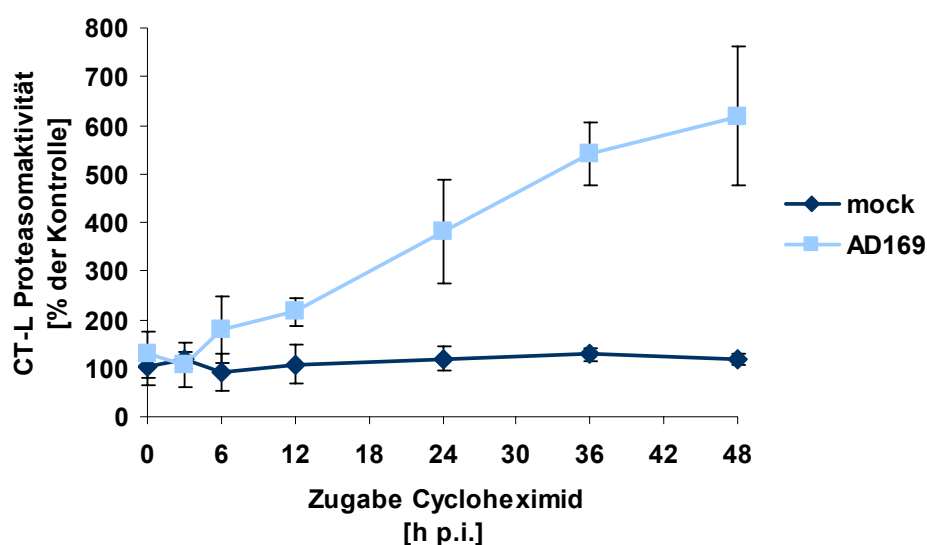


Abb. 13: Abhängigkeit des Effekts von Cycloheximid vom Zeitpunkt der Zugabe. HELF wurden nicht infiziert (mock) oder mit HCMV AD169 (MOI 1) infiziert. Die Zugabe von 25 µg/ml Cycloheximid erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 3, 6, 12, 24, 36 oder 48 h) nach Infektion. Als Kontrolle dienten nichtinfizierte HELF, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt wurden. Die CT-L Proteasomaktivität wurde 72 h p.i. in Zellextrakten gemessen. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die nichtinfizierte, Lösungsmittel-behandelte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunkts aus drei unabhängigen Experimenten.

Erfolgte die Zugabe von 25 µg/ml Cycloheximid in der sehr frühen Phase des Replikationszyklus (0 h bzw. 3 h p.i.), so wurde dadurch die Virus-vermittelte

Induktion der CT-L Aktivität fast vollständig aufgehoben (siehe Abb. 13). In HCMV-infizierten HELF, welche ab 6 h oder 12 h p.i. mit Cycloheximid behandelt wurden, lag die CT-L Proteasomaktivität bereits um durchschnittlich 78% bzw. 116% über dem Niveau der nichtinfizierten, behandelten Zellen. Wurde Cycloheximid 24, 36 oder 48 h p.i. zugegeben, so konnte eine deutliche Induktion der CT-L Proteasomaktivität in infizierten HELF beobachtet werden, die umso stärker ausgeprägt war, je später die Zugabe der Substanz erfolgte. Die Behandlung von nichtinfizierten Zellen mit Cycloheximid bewirkte unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe keine Veränderung der CT-L Proteasomaktivität.

Um sicherzustellen, dass die Expression der entsprechenden viralen Proteinklassen (IE, E bzw. L) in Anwesenheit von Cycloheximid inhibiert war, wurden Deckglaskulturen von HELF in 24 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 1×10^5 /Well) mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 1 infiziert und ebenfalls ab 0, 3, 6, 12, 24, 36 oder 48 h p.i. mit 25 µg/ml Cycloheximid inkubiert. Als Kontrolle dienten nichtinfizierte (mock) und HCMV-infizierte HELF, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt wurden (Zugabe 0 h p.i.). Die Zellen wurden 72 h p.i. für eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen das sehr frühe Protein IE1, die frühen Proteine pUL112/113 oder das späte *major capsid protein* (MCP) fixiert (vergleiche Abschnitt 2.2.2.4). Als Sekundärantikörper dienten anti-Maus Cy3-konjugierte F(ab')₂ Fragmente. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops und einer Digitalkamera in Verbindung mit der Cell D Software (Olympus) dokumentiert.

Auch wenn Cycloheximid unmittelbar nach Adsorption der Viruspartikel (0 h p.i.) zugegeben wurde, konnten vereinzelt IE1- oder pUL112/113-positive Zellen detektiert werden (siehe Abb. 14). Wurden die Zellen ab 3 h p.i. oder zu späteren Zeitpunkten mit Cycloheximid inkubiert, so hatte dies keinen weiteren Einfluss auf die Expression von IE1. Die Expression von pUL112/113 war bis ca. 12 h p.i. sensitiv für die Behandlung mit Cycloheximid. Das späte Protein MCP konnte nur detektiert werden, wenn die Zugabe von Cycloheximid 36 h p.i. oder später erfolgte.

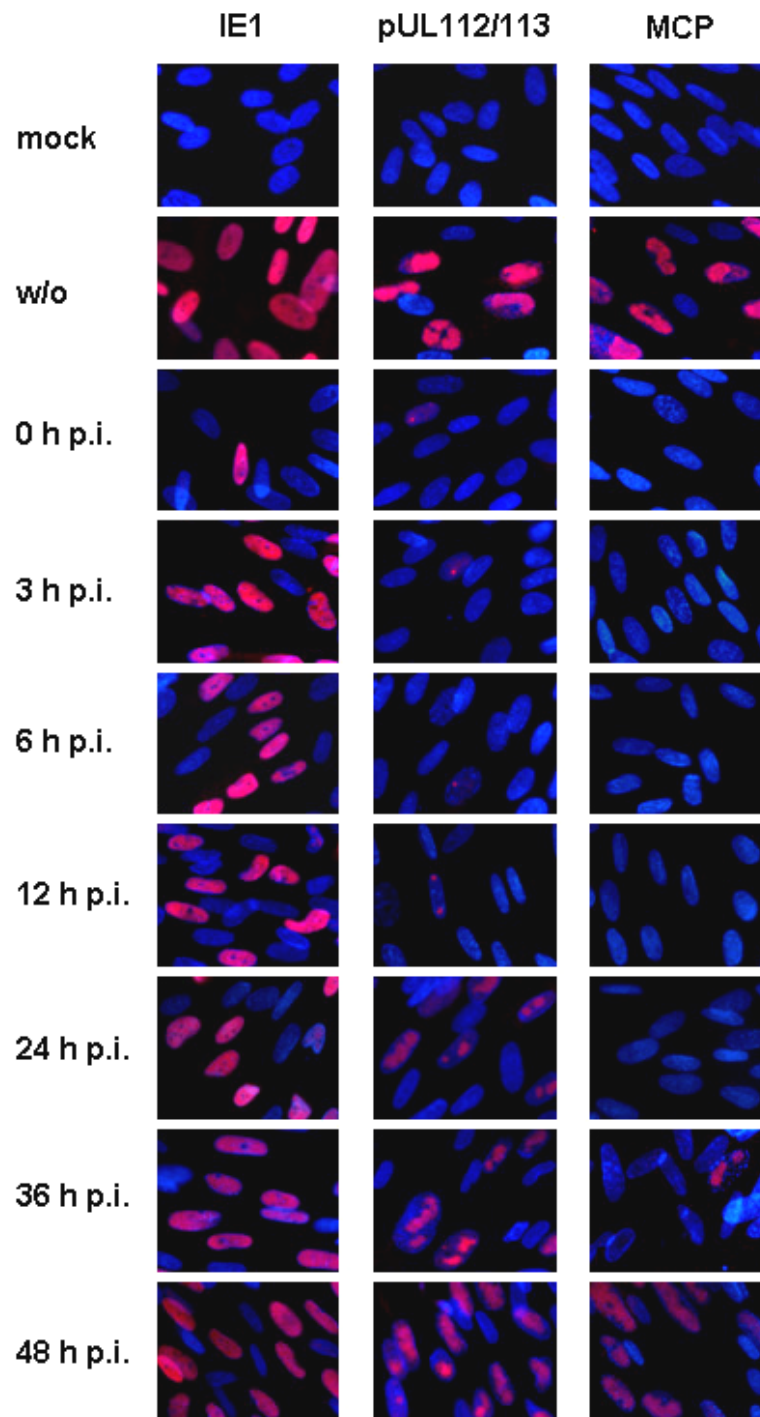


Abb. 14: Hemmung der HCMV-Proteinexpression durch Cycloheximid in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe. HELF wurden mit HCMV AD169 mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zugabe von 25 µg/ml Cycloheximid erfolgte 0, 3, 6, 12, 24, 36 oder 48 h p.i.. Als Kontrolle dienten nichtinfizierte (mock) und HCMV-infizierte HELF (w/o), die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt wurden. 72 h p.i. wurden die Zellen fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen die viralen Proteine IE1, pUL112/113 oder MCP durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend ergaben diese Analysen, dass die Induktion der CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF am stärksten gehemmt werden kann, wenn die virale Proteinexpression bereits in der sehr frühen Phase blockiert wird. Daneben bewirkte jedoch auch die Hemmung der Proteinexpression in der frühen Phase eine deutliche Abschwächung der Induktion der CT-L Proteasomaktivität. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass HCMV IE- und/oder E-Proteine an der Induktion der CT-L Proteasomaktivität beteiligt sind, während die späten Strukturproteine bei diesem Prozess nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

3.2 Charakterisierung des anti-HCMV-Effekts von Proteasominhibitoren (PI)

3.2.1 Einfluss von PI auf die HCMV-Replikation

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die HCMV-Infektion einen deutlichen Anstieg der CT-L Proteasomaktivität in HELF verursacht (siehe Abschnitt 3.1.1 und 3.1.4). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich eine erhöhte Proteasomaktivität günstig auf die Virusreplikation auswirkt. Um zu testen, welchen Effekt die Hemmung des Proteasoms auf die Virusreplikation hat, wurden Plaquereduktionsassays mit verschiedenen PI durchgeführt.

Dazu wurden HELF in 12 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 5×10^5 /Well) mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 0.001 infiziert und mit steigenden Konzentrationen von PI (MG132, MG262, BSc2118 oder Lactacystin) bzw. mit dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels (Kontrolle) inkubiert. Die reversiblen Inhibitoren BSc2118, MG132 und MG262 wurden täglich (BSc2118) bzw. an den Tagen 3 und 5 p.i. (MG132, MG262) erneut zugegeben. Die Zellen wurden am Tag 7 p.i. für eine immunzytochemische Färbung gegen das virale Protein IE1 fixiert (siehe Abschnitt 2.2.1.6). Als Sekundärantikörper diente ein anti-Maus IgG HRP-Konjugat. Die Auszählung der Plaques erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Die Plaquezahl pro Well der jeweiligen Lösungsmittel-behandelten Kontrolle wurde 100% gesetzt.

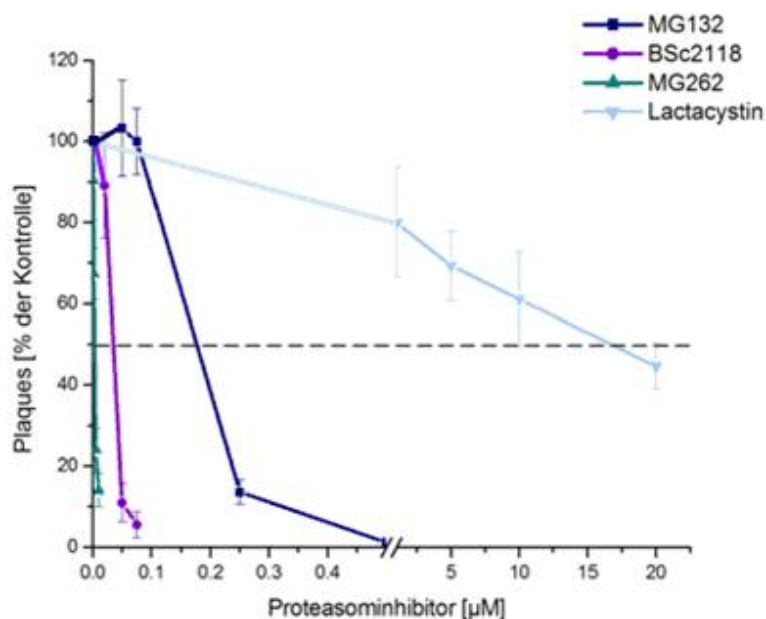


Abb. 15: Einfluss von PI auf die HCMV-Replikation. HELF wurden mit HCMV AD169 infiziert (MOI 0.001) und mit steigenden Konzentrationen von PI (MG132, MG262, BSc2118 oder Lactacystin) für sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Plaques mittels immunzytochemischer Färbung gegen HCMV IE1 (mAb p63-27) nachgewiesen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet 50% der Plaquezahl bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle und dient zur Abschätzung der IC_{50} . Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die jeweilige Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Parallelansätzen.

Abbildung 15 zeigt, dass die HCMV-Replikation durch alle untersuchten PI gehemmt wurde. Anhand des Kurvenverlaufs kann die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der einzelnen PI graphisch bestimmt werden (Überblick siehe Tab. 2). Die IC_{50} gibt die Konzentration des Inhibitors an, bei welcher die Virusreplikation um 50% gegenüber der Kontrolle (100%) reduziert ist. Wie aus Abbildung 15 bzw. Tabelle 2 zu entnehmen ist, waren bei den einzelnen PI jeweils unterschiedliche Dosen erforderlich, um eine 50%ige Hemmung der Virusreplikation zu erreichen. Während MG262, BSc2118 und MG132 die HCMV-Replikation schon in sehr geringer Konzentration effizient unterdrückten, wurden deutlich höhere Konzentrationen von Lactacystin benötigt, um den gleichen Effekt zu erzielen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Hemmung des Proteasoms in proliferierenden Zellen zur Induktion von Apoptose führen kann [Drexler, 1997; Drexler, 2000; Fribley, 2006]. Für die hier beschriebenen Versuche

wurden zwar konfluente und damit proliferationsinaktive Zellen eingesetzt. Um dennoch ausschließen zu können, dass die Virusreplikation aufgrund der Schädigung der Wirtszelle gehemmt war, wurde die halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) für alle verwendeten PI mittels XTT Assay bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1.8). Tabelle 2 zeigt, dass die CC_{50} für alle untersuchten Inhibitoren 4-55fach über dem Wert für die IC_{50} liegt. Die Hemmung der Virusreplikation kann somit nicht auf zytotoxische Nebeneffekte der PI zurückgeführt werden.

Tab. 2: Übersicht über IC_{50} und CC_{50} der verwendeten PI. Die IC_{50} wurde mittels Plaquereduktionsassay ermittelt. Die Bestimmung der CC_{50} erfolgte mittels XTT Assay. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten.

Proteasominhibitor	IC_{50}	CC_{50}
MG132	$0.110 \pm 0.014 \mu\text{M}$	$1.05 \pm 0.11 \mu\text{M}$
BSc2118	$0.020 \pm 0.001 \mu\text{M}$	$1.10 \pm 0.14 \mu\text{M}$
MG262	$0.0030 \pm 0.0012 \mu\text{M}$	$0.012 \pm 0.002 \mu\text{M}$
Lactacystin	$13.53 \pm 3.73 \mu\text{M}$	$60.08 \pm 9.99 \mu\text{M}$

Für weiterführende Experimente wurden die Inhibitoren MG132 und Lactacystin ausgewählt. MG132 ist ein sehr gebräuchlicher Proteasominhibitor, wodurch eine gute Vergleichbarkeit der Daten mit anderen Studien ermöglicht wird. Lactacystin wurde ausgewählt, da sich dieser Inhibitor durch eine hohe Spezifität auszeichnet [Mellgren, 1997]. Auf der Grundlage der IC_{50} - und CC_{50} -Werte wurden $0.5 \mu\text{M}$ für MG132 bzw. $20 \mu\text{M}$ für Lactacystin als Arbeitskonzentration festgelegt. Um Informationen darüber zu erhalten, wie stark die CT-L Proteasomaktivität bei der jeweiligen Arbeitskonzentration reduziert ist, wurden HELF in 25 cm^2 Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1×10^6 /Flasche) für 24 h mit $0.5 \mu\text{M}$ MG132 bzw. $20 \mu\text{M}$ Lactacystin inkubiert. Als Kontrolle dienten HELF, die mit dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels inkubiert wurden. Die Messung der CT-L Proteasomaktivität erfolgte in Zellextrakten (siehe Abschnitt 2.2.2.7) unter Verwendung eines Fluorometers sowie der KC4 Software (BioTek Instruments).

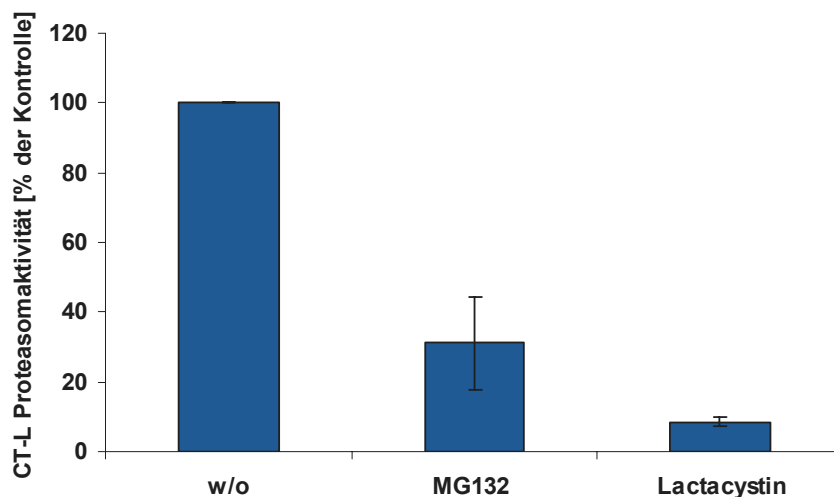


Abb. 16: Hemmung der CT-L Proteasomaktivität durch PI. HELF wurden mit 0.5 μ M MG132 oder 20 μ M Lactacystin bzw. der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (w/o) inkubiert. Die CT-L Proteasomaktivität wurde nach 24 h in Zellextrakten gemessen. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die jeweilige Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten.

Die CT-L Proteasomaktivität war bei den untersuchten Konzentrationen um durchschnittlich 70% (MG132) bzw. 90% (Lactacystin) gegenüber der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle reduziert (siehe Abb. 16).

3.2.2 Einfluss von MG132 auf die VZV-Replikation

Für das α -Herpesvirus HSV-1 ist bereits bekannt, dass die Virusreplikation sensitiv gegenüber PI ist [La Frazia, 2006]. Um zu untersuchen, ob das Proteasom neben HSV-1 und HCMV essentiell für die Replikation weiterer Herpesviren ist, sollte der Einfluss von MG132 auf die Replikation von VZV bestimmt werden.

Dazu wurden HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1×10^6 /Flasche) mit dem VZV Impfstamm Oka oder dem VZV Wildtypisolat JoSt mit einer MOI von 0.05 infiziert (siehe Abschnitt 2.2.1.3) und mit 0.5 μ M MG132 oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt. Die Zellen wurden 72 h p.i. zur Bestimmung des Titers (siehe Abschnitt 2.2.1.5) geerntet.

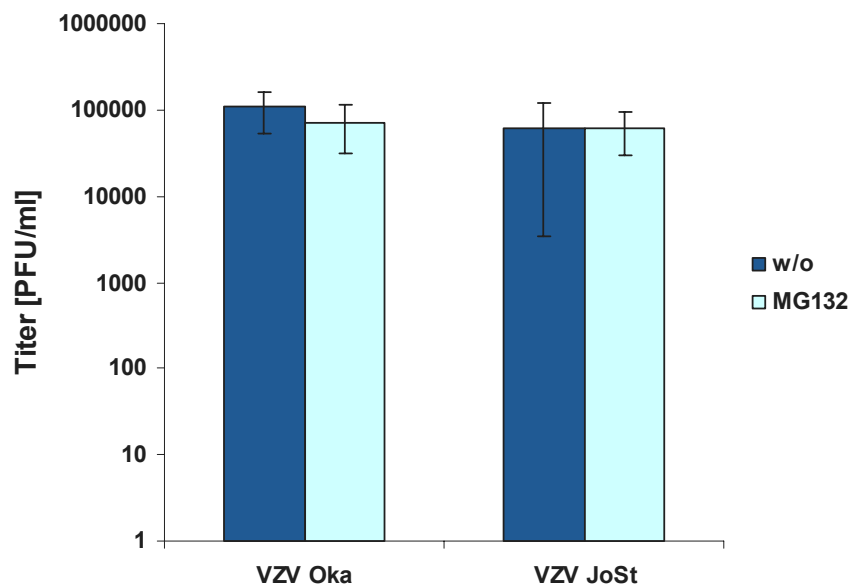


Abb. 17: Einfluss von MG132 auf die VZV-Replikation. HELF wurden mit VZV Oka oder VZV JoSt infiziert (MOI 0.05) und mit 0.5 μ M MG132 oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) inkubiert. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte 72 h p.i.. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus drei unabhängigen Versuchen.

Im Gegensatz zu HSV-1 und HCMV wurde die VZV-Replikation nicht durch MG132 inhibiert (siehe Abb. 17). Sowohl der attenuierte Impfstamm Oka als auch das Wildtypisolat JoSt replizierten zu vergleichbaren Virustitern in MG132-behandelten HELF und Lösungsmittel-behandelten Kontrollzellen.

3.2.3 Einfluss von Calpaininhibitoren auf die HCMV-Replikation

Für die meisten PI aus der Klasse der Peptidaldehyde (z.B. MG132) ist neben der Hemmung des Proteasoms auch eine unspezifische Wirkung auf nicht-proteasomale zelluläre Proteasen wie beispielsweise Calpaine und Cathepsine beschrieben [Mellgren, 1997; Tsubuki, 1996]. Um auszuschließen, dass der beobachtete anti-HCMV-Effekt von PI auf der Hemmung nicht-proteasomaler zellulärer Proteasen beruht, wurden Plaquereduktionsassays mit den Calpaininhibitoren I und II durchgeführt, welche die Aktivität von Calpain I und II sowie Cathepsin B und L hemmen. Beide Calpaininhibitoren gehören darüber hinaus ebenfalls zur Klasse der

Peptidaldehyde und weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zu MG132 auf (siehe Abschnitt 2.1.9.2).

Für den Versuch wurden HELF in 12 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 5×10^5 /Well) mit dem Laborstamm AD169 infiziert (MOI 0.001) und mit steigenden Konzentrationen der Calpaininhibitoren bzw. als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (DMSO) inkubiert. Nach Fixierung der Zellen am Tag 7 p.i. wurde die Bildung von Plaques mittels immunzytochemischer Färbung gegen das virale Protein IE1 analysiert (siehe Abschnitt 2.2.1.6). Als Sekundärantikörper diente ein anti-Maus IgG HRP-Konjugat. Die Quantifizierung der Plaques erfolgte am Lichtmikroskop. Die Plaquezahl pro Well der DMSO-behandelten Kontrolle wurde 100% gesetzt.

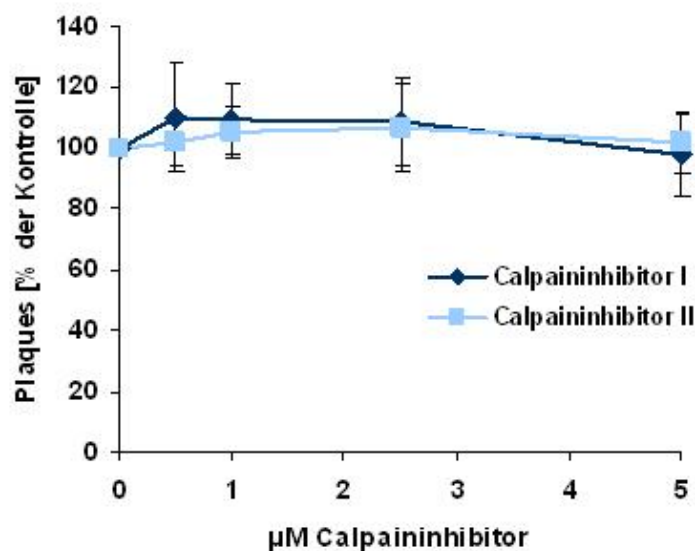


Abb. 18: Einfluss von Calpaininhibitoren auf die HCMV-Replikation. HELF wurden mit HCMV AD169 infiziert (MOI 0.001) und mit steigenden Konzentrationen von Calpaininhibitor I oder Calpaininhibitor II bzw. dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels für sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Plaques mittels immunzytochemischer Färbung gegen IE1 (mAb p63-27) nachgewiesen. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Parallelansätzen.

Die Aktivität von aufgereinigtem Calpain ist bei einer Konzentration von 1 μ M Calpaininhibitor I bzw. II um 90% reduziert [Figueiredo-Pereira, 1994]. Aus den hier durchgeführten Plaquereduktionsassays wurde ersichtlich, dass die Calpaininhibitoren I und II auch bei einer Konzentration von 5 μ M keinen hemmenden Effekt auf die HCMV-Replikation ausüben (siehe Abb. 18).

Laut einer Studie von Figueiredo-Pereira *et al.* zur Selektivität von Calpaininhibitoren ist die CT-L Aktivität aufgereinigter Proteasomen aus der Rinderhypophyse in Anwesenheit von 10 μM Calpaininhibitor I bzw. 25 μM Calpaininhibitor II um 50% reduziert [Figueiredo-Pereira, 1994]. Obwohl Calpaininhibitoren in dem hier durchgeführten Experiment nur in Konzentrationen von 0.5-5 μM eingesetzt wurden, sollte im Hinblick auf das Ergebnis der Plaquereduktionsassays (siehe Abb. 18) ausgeschlossen werden, dass die CT-L Proteasomaktivität bei diesen Konzentrationen reduziert war.

Dazu wurden HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1×10^6 /Flasche) für 72 h mit steigenden Konzentrationen der Calpaininhibitoren I und II inkubiert. Als Kontrolle dienten HELF, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (DMSO) inkubiert wurden. Die Messung der CT-L Proteasomaktivität erfolgte in Zellextrakten (siehe Abschnitt 2.2.2.7) unter Verwendung eines Fluorometers sowie der KC4 Software (BioTek Instruments).

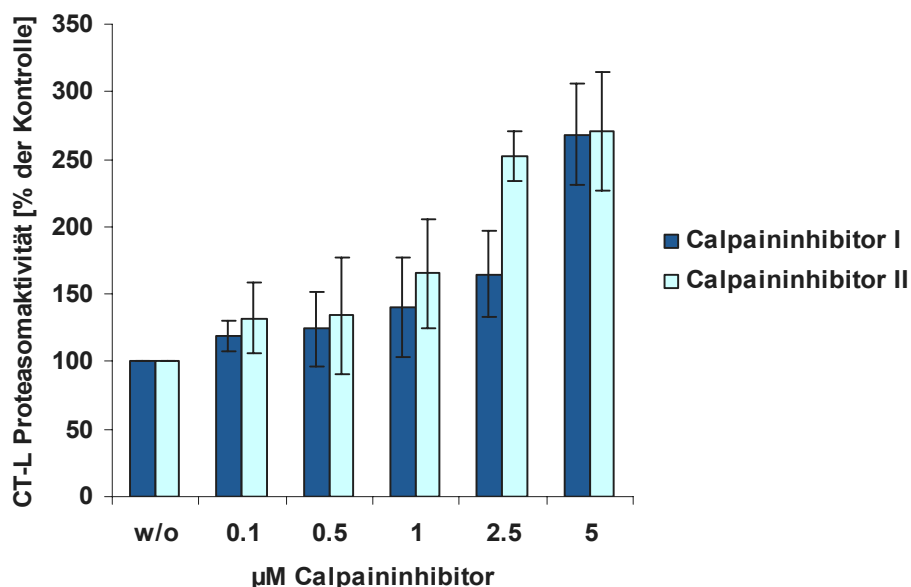


Abb. 19: Einfluss von Calpaininhibitoren auf die CT-L Proteasomaktivität. HELF wurden mit steigenden Konzentrationen von Calpaininhibitor I oder Calpaininhibitor II bzw. mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) inkubiert. Die CT-L Proteasomaktivität wurde nach 72 h in Zellextrakten gemessen. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus vier unabhängigen Experimenten.

Entgegen den Beobachtungen von Figueiredo-Pereira *et al.* war die CT-L Proteasomaktivität in HELF in Anwesenheit von 0.1-5 μM Calpaininhibitor I bzw. Calpaininhibitor II im Vergleich zur Kontrolle nicht reduziert (siehe Abb. 19). Bei einer Konzentration von 5 μM Calpaininhibitor I bzw. Calpaininhibitor II war die CT-L Aktivität sogar um ca. 170% im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle erhöht. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte darin bestehen, dass in der Zelle Kontrollmechanismen existieren, durch die eine Steigerung der Proteasomaktivität induziert wird, um den gehemmten nicht-proteasomalen Degradationsweg zu kompensieren. Zusammenfassend kann aufgrund dieser Ergebnisse geschlossen werden, dass der anti-HCMV-Effekt von PI unabhängig von der unspezifischen Hemmung nicht-proteasomaler zellulärer Proteasen ist.

3.2.4 Effekt von PI auf die Bildung infektiöser HCMV-Partikel

Die Ergebnisse aus den Plaquereduktionsassays zeigten, dass die Virusreplikation effektiv durch PI unterdrückt wird (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Um der Frage nachzugehen, ob unter dem Einfluss von PI überhaupt virale Kapside oder infektiöse Viruspartikel gebildet werden, wurden behandelte und unbehandelte Zellen elektronenmikroskopisch analysiert.

Für den Versuch wurden HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 1 infiziert und mit 0.5 μM MG132 bzw. 20 μM Lactacystin oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels behandelt. Die Zellen wurden 72 h p.i. geerntet und mit 2.5% (v/v) Glutaraldehyd fixiert. Nach Kontrastierung mit 0.1% (w/v) Tannin und Färbung mit 0.2% (w/v) Uranylacetat wurden die Zellen schließlich in Epon eingebettet (siehe Abschnitt 2.2.2.6). Ultradünnschnitte der Proben wurden auf Kupfernetze übertragen und mit Hilfe eines TecnaiTM G2 (FEI Company) Elektronenmikroskops bei einer konstanten Spannung von 120 kV analysiert. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer 2K MegaView2-Digitalkamera bei kalibrierten Vergrößerungen.

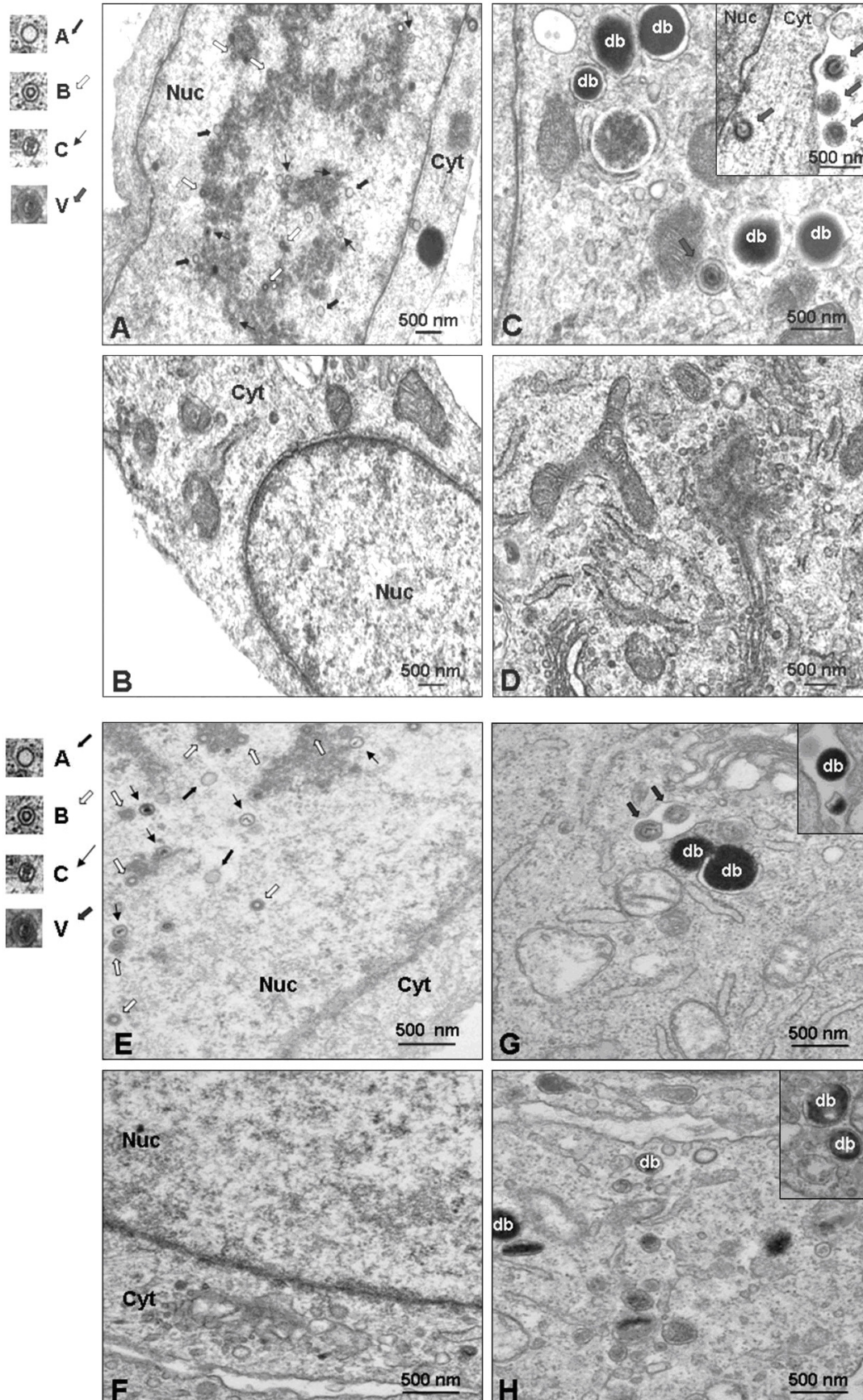


Abb. 20: Elektronenmikroskopische Analyse von Ultradünnschnitten HCMV-infizierter HELF. HELF wurden mit HCMV AD169 infiziert (MOI 1) und mit 0.5 μ M MG132 (**B, D**), 20 μ M Lactacystin (**F, H**) oder dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels (**A, C, E, G**) inkubiert. Die Zellen wurden 72 h p.i. mit 2.5% (v/v) Glutaraldehyd fixiert und eingebettet. **A, B, E** und **F** zeigen Ausschnitte aus dem Zellkern (Nuc); **C, D, G** und **H** zeigen Ausschnitte aus dem Zytoplasma (Cyt). A-Kapside sind durch breite schwarze Pfeile, B-Kapside durch weiße Pfeile und C-Kapside durch schmale schwarze Pfeile gekennzeichnet (siehe Legende). Virionen sind durch breite graue Pfeile dargestellt. Db bezeichnet *dense bodies*. Das Größenmaß entspricht 500 nm. Die Darstellung zeigt ein repräsentatives von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Während in den Kontrollzellen eine große Anzahl von A-, B- und C-Kapsiden (siehe Abschnitt 1.4.3) im Zellkern sowie Virionen im Zytoplasma zu finden war, konnten in den MG132- bzw. Lactacystin-behandelten Zellen weder Kapside noch Virionen oder nicht-infektiöse umhüllte Partikel (NIEPs) detektiert werden (siehe Abb. 20). Das Zytoplasma der Kontrollzellen enthielt zudem zahlreiche so genannte *dense bodies*. Als *dense bodies* werden umhüllte, sphärische Strukturen bezeichnet, die weder ein Kapsid noch virale DNA enthalten [Irmieri, 1983; Sarov, 1975]. Sie bestehen überwiegend aus viralen Tegumentproteinen wie beispielsweise pp65 und sind von einer Lipidmembran umgeben, in die virale Glykoproteine eingelagert sind [Fiala, 1976]. Im Zytoplasma der MG132-behandelten Zellen wurden keine *dense bodies* detektiert. Im Gegensatz dazu konnten *dense bodies* im Zytoplasma der Lactacystin-behandelten Zellen beobachtet werden.

Die völlige Abwesenheit von Viruspartikeln in den PI-behandelten Zellen deutet darauf hin, dass die Inhibitoren bereits frühere Prozesse im viralen Replikationszyklus blockieren, so dass die Assemblierung von Kapsiden und die Virusreifung nicht mehr stattfinden können.

3.2.5 Effekt von MG132 auf den Viruseintritt in die Wirtszelle

Da PI entsprechend einer Studie von Khor *et al.* mit dem Eintritt von Influenza in die Wirtszelle interferieren [Khor, 2003], sollte für HCMV zunächst die Abhängigkeit dieses Schritts des viralen Replikationszyklus vom Ubiquitin-Proteasom-System näher untersucht werden.

Für den Versuch wurden Deckglaskulturen von HELF in 24 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 1×10^5 /Well) für 30 min bei 37°C mit 1 mg/ml Heparin, 0.5 μ M MG132 oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels vorinkubiert.

Heparin verhindert die Adsorption des Virus, indem es sich an das virale Glykoprotein gB und/oder Komponenten des Glykoproteinkomplexes gCII anlagert und diese blockiert, wodurch das Virus nicht mehr an Heparansulfatproteoglykane auf der Zelloberfläche binden kann [Compton, 1993; Kari, 1992; Kari, 1993]. Anschließend wurden die Zellen mit dem HCMV BAC HB5-GFP mit einer MOI von 1 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte HELF. Die Zellen wurden 24 h p.i. für eine Kernfärbung mit DAPI fixiert (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Die Analyse der Zellen erfolgte bei 400facher Vergrößerung unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops in Verbindung mit der Cell D Software (Olympus). Zur Quantifizierung der HCMV-positiven Zellen wurden pro Ansatz insgesamt fünf Gesichtsfelder ausgezählt.

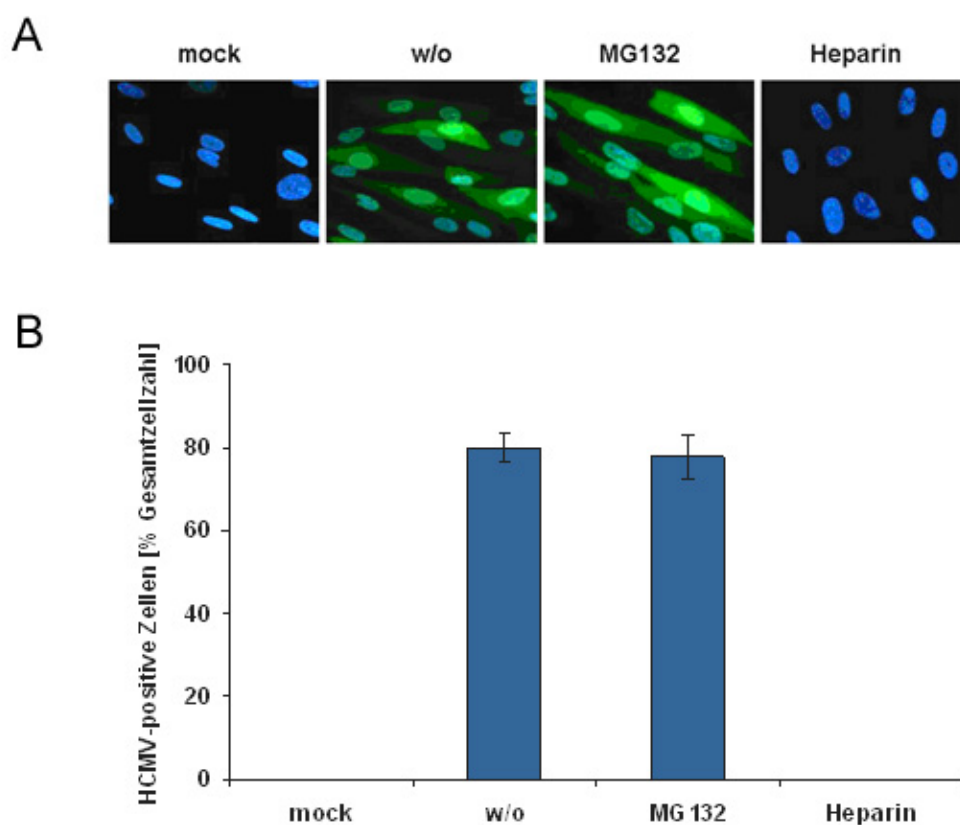


Abb. 21: Einfluss von MG132 auf den Eintritt von HCMV in die Wirtszelle. HELF wurden bei 37°C für 30 min mit 1 mg/ml Heparin, 0.5 µM MG132 oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) vorinkubiert und im Anschluss mit dem HCMV BAC HB5-GFP infiziert (MOI 1). Als Kontrolle dienten nichtinfizierte HELF (mock). Die Zellen wurden 24 h p.i. fixiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. (A) Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen. (B) Zur Quantifizierung der HCMV-positiven Zellen wurden bei 400facher Vergrößerung fünf Gesichtsfelder ausgezählt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (± Standardabweichung) bezogen auf die Gesamtzellzahl.

In Übereinstimmung mit den Studien von Kari & Gehrz verhinderte die Vorinkubation der Zellen mit Heparin den Eintritt des Virus in die Wirtszelle (siehe Abb. 21). Wie zudem aus Abbildung 21 B hervorgeht, wurde bei den MG132-behandelten Proben die gleiche Anzahl HCMV-positiver Zellen wie bei den Kontrollproben detektiert (78% versus 80%). Somit scheint die Hemmung des Proteasoms durch MG132 keinen Einfluss auf den Eintritt von HCMV in die Wirtszelle zu haben.

Um sicherzustellen, dass die CT-L Proteasomaktivität bereits nach 30 min Inkubationszeit signifikant reduziert ist, wurden HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) mit 0.5 µM MG132 inkubiert und nach 0, 15, 30, 45 oder 60 min zur Bestimmung der CT-L Aktivität geerntet (siehe Abschnitt 2.2.2.7). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt wurden. Die CT-L Proteasomaktivität wurde mit Hilfe eines Fluorometers und der KC4 Software (BioTek Instruments) gemessen.

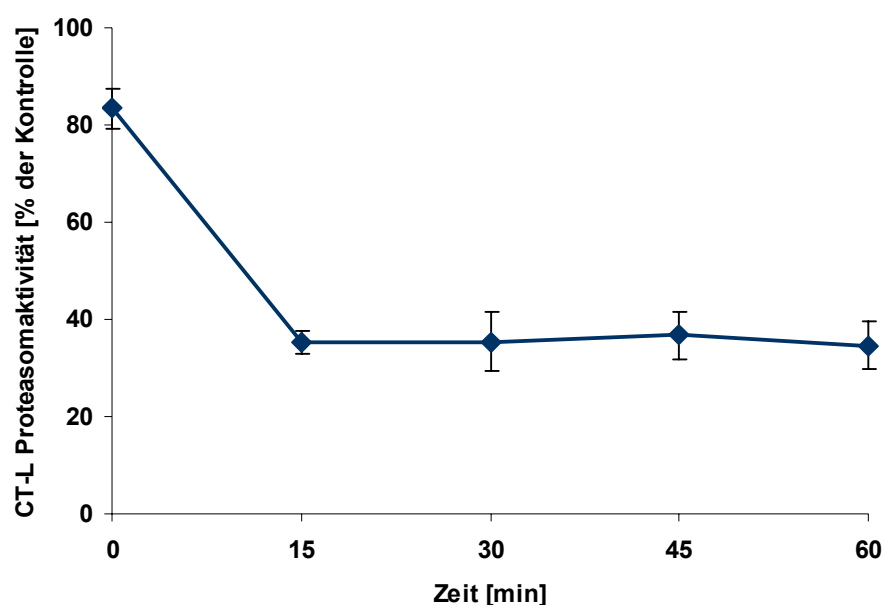


Abb. 22: Kinetik der Hemmung der CT-L Proteasomaktivität durch MG132. HELF wurden mit 0.5 µM MG132 behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe des Inhibitors (0-60 min) zur Messung der CT-L Proteasomaktivität geerntet. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt wurden. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (± Standardabweichung) bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Zugabe von MG132 hatte eine sehr rasche Auswirkung auf die CT-L Proteasomaktivität. Bereits 15 min nach Zugabe des Inhibitors war die CT-L Aktivität um 65% reduziert und blieb dann bis 60 min nach Zugabe des Inhibitors unverändert (siehe Abb. 22). Die 30minütige Vorinkubation der Zellen mit MG132 ist somit hinreichend, um eine signifikante Hemmung des Proteasoms zu erzielen.

Zusammenfassend wurde deutlich, dass der Eintritt von HCMV in die Wirtszelle unabhängig vom Ubiquitin-Proteasom-System abläuft.

3.2.6 Zeitliche Abhängigkeit des anti-HCMV-Effekts von MG132

Die vorliegenden Ergebnisse aus den Plaquereduktionsassays und den elektronenmikroskopischen Analysen (siehe Abschnitt 3.2.1 und 3.2.4) haben gezeigt, dass PI die virale Replikation komplett unterdrücken. Um herauszufinden, in welcher Phase der virale Replikationszyklus am sensitivsten für die Hemmung des Proteasoms ist, sollte die Abhängigkeit des inhibitorischen Effekts von MG132 vom Zeitpunkt der Zugabe nach Infektion mittels Plaquereduktionsassay untersucht werden („*time of addition*“-Analyse).

Dazu wurden HELF in 12 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 5×10^5 /Well) mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 0.001 infiziert. Die Zugabe von 0.5 μ M MG132 erfolgte unmittelbar nach der Adsorption der Viruspartikel (Zeitpunkt 0 h p.i.) oder 24, 48, 72 bzw. 96 h p.i.. Da es sich bei MG132 um einen reversiblen Inhibitor handelt, wurden die Zellen jeweils alle drei Tage nach der ersten Zugabe erneut mit 0.5 μ M MG132 behandelt. Als Kontrolle dienten HCMV-infizierte HELF, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert wurden. Am Tag 7 p.i wurden die Zellen fixiert. Anschließend erfolgte die immunzytochemische Färbung gegen die viralen Proteine IE1/2 (siehe Abschnitt 2.2.1.6). Als Sekundärantikörper diente ein anti-Maus IgG HRP-Konjugat. Die Anzahl der Plaques pro Well wurde unter Verwendung eines Lichtmikroskops ermittelt. Die Plaquezahl pro Well der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle wurde 100% gesetzt.

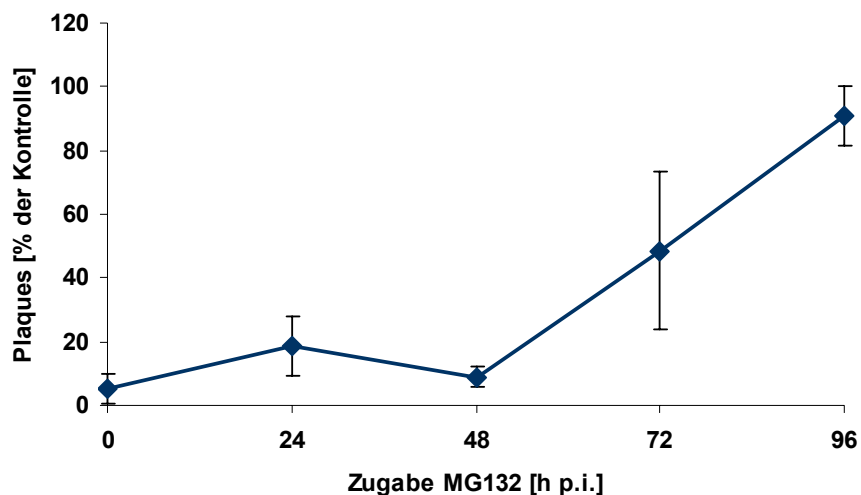


Abb. 23: Abhängigkeit des Effekts von MG132 vom Zeitpunkt der Zugabe. HELF wurden mit HCMV AD169 infiziert (MOI 0.001). Die Zugabe von 0.5 μ M MG132 erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (0, 24, 48, 72 oder 96 h p.i.). Als Kontrolle dienten HCMV-infizierte HELF, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt wurden. Am Tag 7 p.i. wurden die Zellen fixiert und die Plaques mittels immunzytochemischer Färbung gegen IE1/2 (mAb E13) nachgewiesen. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Parallelansätzen.

Aus Abbildung 23 wird ersichtlich, dass die Virusreplikation in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe unterschiedlich stark durch MG132 gehemmt wurde. Erfolgte die Zugabe von MG132 direkt nach der Adsorption, so wurde die Replikation von HCMV im Mittel um 95% unterdrückt. Bei Zugabe des Inhibitors 24 h p.i. konnte eine durchschnittlich 80%ige Hemmung der Virusreplikation beobachtet werden. Wurde MG132 48 h p.i. zugegeben, so resultierte daraus eine Hemmung der Virusreplikation um durchschnittlich 91%. Selbst bei Zugabe nach 72 h, wenn ein Replikationszyklus bereits vollständig abgelaufen ist, konnte die HCMV-Replikation noch um durchschnittlich 54% gehemmt werden. Wurde MG132 erstmalig nach mehr als 72 h zugegeben, so hatte der Inhibitor keinen hemmenden Einfluss auf die Virusreplikation.

Zusammenfassend konnte in diesen Experimenten der inhibitorische Effekt von MG132 auf die HCMV-Replikation bestätigt werden. Das Ausmaß der Hemmung war stark vom Zeitpunkt der Zugabe des Inhibitors abhängig, wobei sich eine besonders ausgeprägte Sensitivität in der sehr frühen und der frühen Phase des viralen Replikationszyklus zeigte.

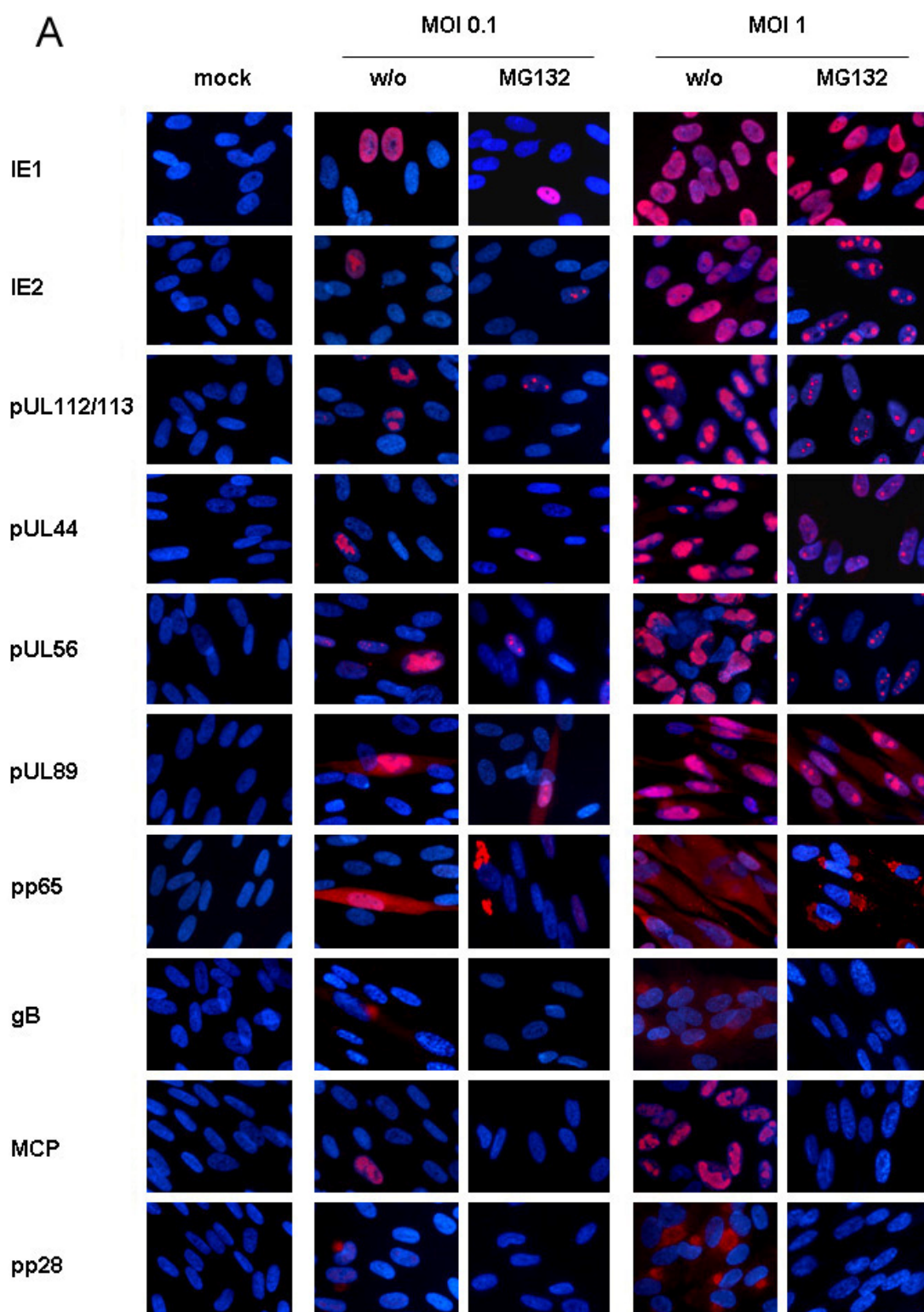
3.2.7 Einfluss von PI auf die virale Proteinexpression

Aus den Arbeiten von Prösch *et al.* war bereits bekannt, dass die Expression von IE1 und IE2 in Anwesenheit von MG132 verringert und zeitlich verzögert ist [Prösch, 2003]. Dabei war die Expression von IE2 stark inhibiert, während die Expression von IE1 nur leicht reduziert erschien. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression des frühen Proteins pUL44 und des *early late*-Proteins pp65 in MG132-behandelten HELF ebenfalls deutlich reduziert ist [Prösch, 2003].

Um den Einfluss von PI auf die virale Proteinsynthese näher zu charakterisieren, sollte im Folgenden die Expression von weiteren viralen Proteinen untersucht werden.

3.2.7.1 Analyse der HCMV-Proteinexpression mittels Immunfluoreszenzfärbung

Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 0.1 bzw. 1 infizierter HELF in 24 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 1×10^5 /Well) wurden mit 0.5 μ M MG132, 20 μ M Lactacystin oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels inkubiert. Die Zellen wurden 72 h p.i. fixiert und mit Primärantikörpern gegen die viralen Proteine IE1, IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56, pUL89, pp65, gB, MCP oder pp28 inkubiert (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Nach Inkubation mit anti-Maus (IE1, IE2, pUL112/113, pUL44, pp65, gB, MCP, pp28) bzw. anti-Human (pUL56, pUL89) Cy3-konjugierten F(ab')₂ Fragmenten und Färbung der Zellkerne mittels DAPI wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert und unter Verwendung einer Digitalkamera sowie der Cell D Software (Olympus) fotografiert.



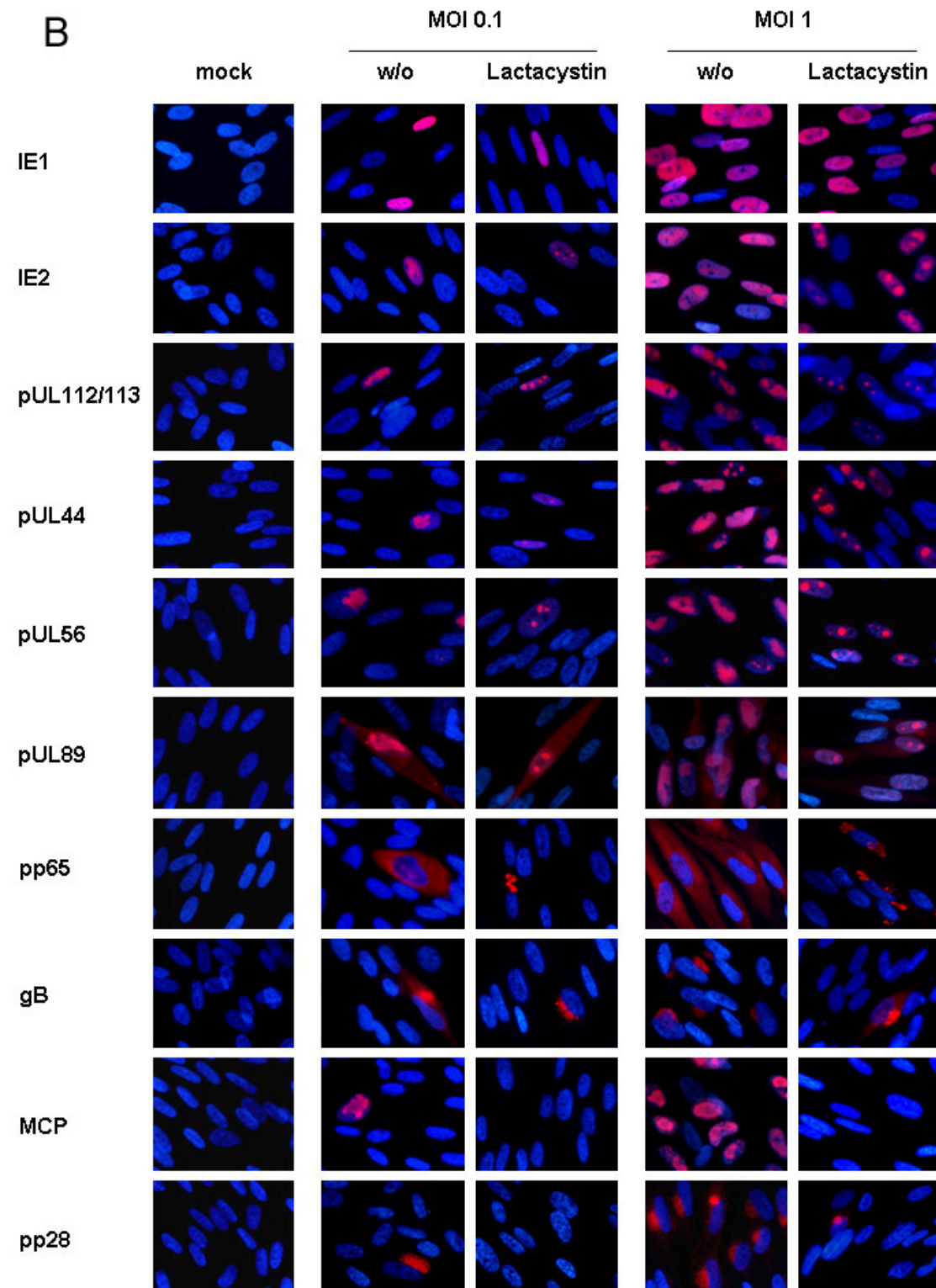


Abb. 24: Einfluss von PI auf die virale Proteinexpression. Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit HCMV AD169 infizierter HELF (MOI 0.1 bzw. 1) wurden mit **(A)** 0.5 μ M MG132 oder **(B)** 20 μ M Lactacystin bzw. dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels (w/o) inkubiert. Die Zellen wurden 72 h p.i. fixiert. Anschließend erfolgte die indirekte Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Antikörpern gegen die viralen Proteine IE1, IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56, pUL89, pp65, gB, MCP und pp28. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen.

Aus Abbildung 24 geht hervor, dass sowohl die Expression als auch die Lokalisation einer Vielzahl der hier untersuchten viralen Proteine in PI-behandelten HELF im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verändert war. Interessanterweise schien darüber hinaus die MOI einen Einfluss auf die Hemmbarkeit der Expression bestimmter viraler Proteine zu haben.

Bei einer MOI von 0.1 war die Anzahl der IE1-positiven Zellen in Anwesenheit von MG132 deutlich verringert. Sowohl in den behandelten Zellen als auch in den Kontrollzellen zeigte IE1 eine diffuse Verteilung im Zellkern (siehe Abb. 24 A). Die Expression des sehr frühen Proteins IE2 sowie der frühen Proteine pUL112/113, pUL44, pUL56 und pUL89 war nach Behandlung mit MG132 stark reduziert. Darüber hinaus veränderte sich das Verteilungsmuster dieser Proteine. In Übereinstimmung mit anderen Studien waren IE2, pUL112/113 und pUL44 in unbehandelten Kontrollzellen in distinkten Arealen des Zellkerns, den so genannten Replikationszentren lokalisiert [Ahn, 1999; Ahn, 1999; Sourvinos, 2007]. Die Terminaseuntereinheiten pUL56 und pUL89 ließen ein den anderen frühen Proteinen ähnliches Expressionsmuster erkennen [Giesen, 2000], wobei pUL89 neben seiner Lokalisation in Replikationszentren auch eine schwache zytoplasmatische Färbung zeigte. In MG132-behandelten HELF war die Bildung großer, nierenförmiger Replikationszentren jedoch gestört. Stattdessen akkumulierten IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56 und pUL89 in kleinen, punktförmigen Prä-Replikationszentren. Das *early late*-Protein pp65 zeigte in Kontrollzellen eine überwiegend zytoplasmatische Verteilung. Nach Behandlung mit MG132 konnte kein Unterschied in der Anzahl pp65-positiver Zellen festgestellt werden. Das diffus im Zytoplasma vorliegende Protein akkumulierte in Anwesenheit von MG132 jedoch in perinukleären Aggregaten (siehe Abb. 24 A). In Übereinstimmung mit anderen Studien waren die späten Proteine gB und pp28 in Kontrollzellen in zytoplasmatischen Kompartimenten lokalisiert, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Zellkern befinden [Sanchez, 2000]. Das späte Strukturprotein MCP war in unbehandelten Zellen in Replikationszentren lokalisiert (siehe Abb. 24). MCP, gB und pp28 konnten in MG132-behandelten Zellen nicht mehr nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung war die Expression der späten Proteine gB, MCP und pp28 in MG132-behandelten Zellen auch bei einer

MOI von 1 vollständig unterdrückt (siehe Abb. 24 A). Darüber hinaus erwies sich der Effekt von MG132 auf die Lokalisation von IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56, pUL89 und pp65 als MOI-unabhängig, da diese Proteine auch bei einer MOI von 1 in Prä-Replikationszentren (IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56, pUL89) bzw. perinukleären Aggregaten (pp65) akkumulierten. Überraschenderweise hatte MG132 bei einer MOI von 1 jedoch keinen Einfluss auf die Expression von IE1 (siehe Abb. 24 A).

In parallel durchgeführten Immunfluoreszenzstudien zeigte der hochspezifische Inhibitor Lactacystin einen ähnlichen Effekt wie MG132 auf die Expression und Lokalisation der viralen Proteine (siehe Abb. 24 B). Es war lediglich zu beobachten, dass die Expression der späten Proteine in Anwesenheit von Lactacystin nicht vollständig supprimiert war, so dass vereinzelt gB- bzw. pp28-positive Zellen detektiert wurden. Das Strukturprotein MCP konnte auch in Lactacystin-behandelten Zellen nicht nachgewiesen werden.

3.2.7.2 Analyse der HCMV-Proteinexpression mittels Western Blot

Mit dem Ziel, die Ergebnisse aus den Immunfluoreszenzanalysen zu verifizieren, wurde die virale Proteinexpression in PI-behandelten und unbehandelten HELF mittels Western Blot charakterisiert. Darüber hinaus sollte die MOI-Abhängigkeit des Effekts von PI detailliert untersucht werden.

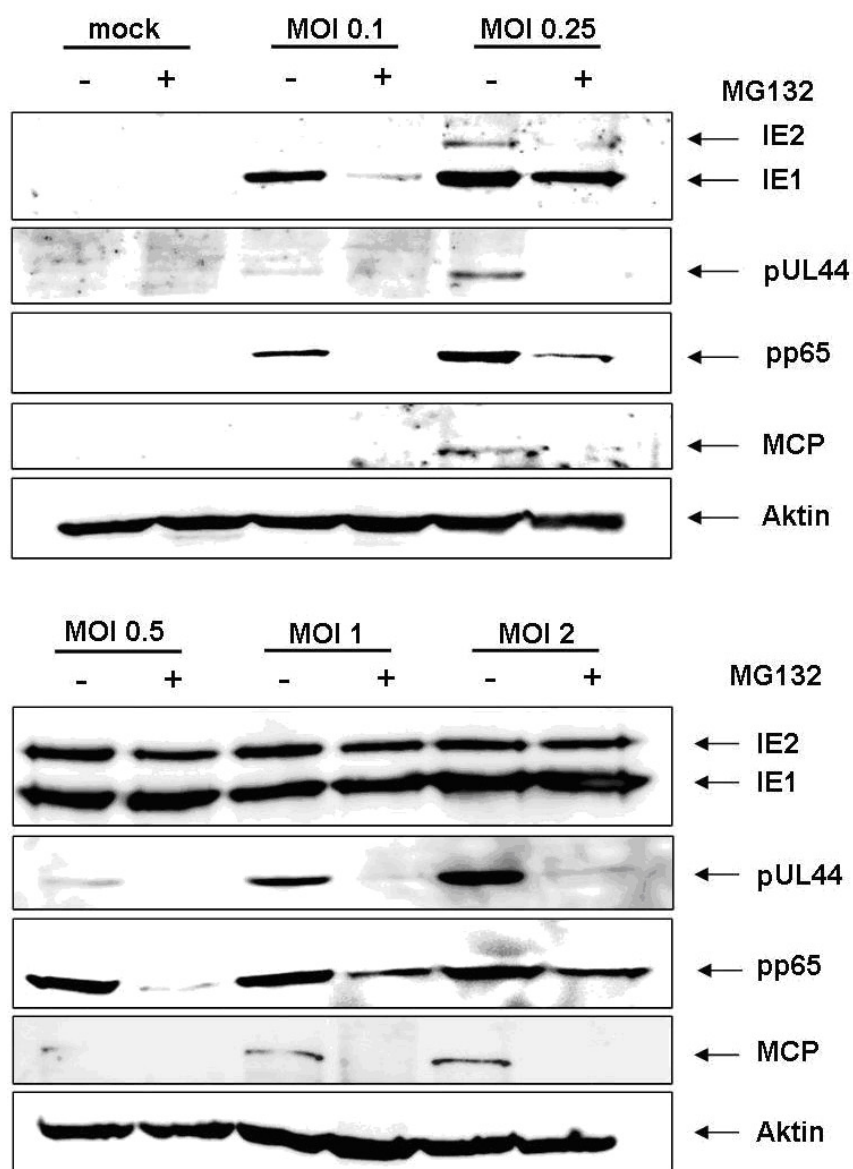
Für den Versuch wurden nichtinfizierte (mock) oder mit dem Laborstamm AD169 mit unterschiedlicher MOI infizierte HELF (MOI 0.1, 0.25, 0.5, 1 oder 2) in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) mit 0.5 µM MG132 oder 20 µM Lactacystin behandelt. Als Kontrolle dienten HELF, die mit dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels inkubiert wurden. Die Zellen wurden 72 h p.i. für eine Auftrennung der Zellextrakte durch SDS-PAGE geerntet (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Für die Western Blot-Analysen wurden Primärantikörper gegen die viralen Proteine IE1/2, pUL44, pp65 und MCP eingesetzt (siehe Abschnitt 2.1.7.1). Als Sekundärantikörper diente ein anti-Maus IgG HRP-Konjugat. Der Einsatz gleicher Proteinmengen wurde

anhand eines Immunoblots gegen das zelluläre Protein Aktin unter Verwendung eines anti-Ziege IgG HRP-konjugierten Sekundärantikörpers überprüft. Analyse und Dokumentation der Immunoblots erfolgten mit Hilfe einer CCD-Kamera unter Verwendung der Kodak Molecular Imaging Software.

Die Western Blot-Analysen ergaben, dass die Expression von IE1 bei einer MOI von 0.1 deutlich durch MG132 gehemmt wurde (siehe Abb. 25 A). Bei einer MOI von 0.25 konnte eine leichte Reduktion der IE1-Proteinmenge beobachtet werden. Wurden die Zellen mit höherer MOI infiziert ($\text{MOI} \geq 0.5$), so war die IE1-Expression nicht mehr durch MG132 hemmbar. Die Expression von IE2 konnte bis zu einer MOI von 0.5 durch MG132 reduziert werden (siehe Abb. 25 A). Bei höherer MOI ($\text{MOI} \geq 1$) lagen gleiche IE2-Proteinlevel in MG132-behandelten Zellen und Kontrollzellen vor. Die Expression des frühen Proteins pUL44 war in MG132-behandelten Zellen bei allen betrachteten MOIs im Vergleich zur Kontrolle nahezu vollständig gehemmt (siehe Abb. 25 A). Lediglich bei einer MOI von 1 bzw. 2 waren äußerst geringe Mengen von pUL44 auch in Anwesenheit von MG132 detektierbar. Die Expression des Tegumentproteins pp65 war unter Einfluss von MG132 bis zu einer MOI von 0.5 deutlich reduziert (siehe Abb. 25 A). Bei höherer MOI war eine Zunahme der Expression von pp65 zu beobachten; die Expressionslevel der unbehandelten Kontrolle wurden jedoch nicht erreicht. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Immunfluoreszenzanalysen war die Expression des späten Proteins MCP in Anwesenheit von MG132 bei allen untersuchten MOIs vollständig gehemmt (siehe Abb. 25 A).

Der hochspezifische Inhibitor Lactacystin zeigte den gleichen Effekt wie MG132 auf die Expression von pUL44, pp65 und MCP (siehe Abb. 25 B). Die Expression von IE1 und IE2 war dagegen bei einer MOI von 0.1 weniger sensitiv für die Behandlung mit Lactacystin. Während bei dieser MOI in MG132-behandelten Zellen die Expression von IE1 und IE2 deutlich reduziert war, konnte in Anwesenheit von Lactacystin lediglich eine Hemmung der IE2-Expression beobachtet werden. Die IE1-Expressionslevel waren hingegen unverändert. Ähnlich wie bei MG132 lagen bei einer MOI von 1 gleiche IE1/2-Proteinlevel in Lactacystin-behandelten Zellen und Kontrollzellen vor.

A



B

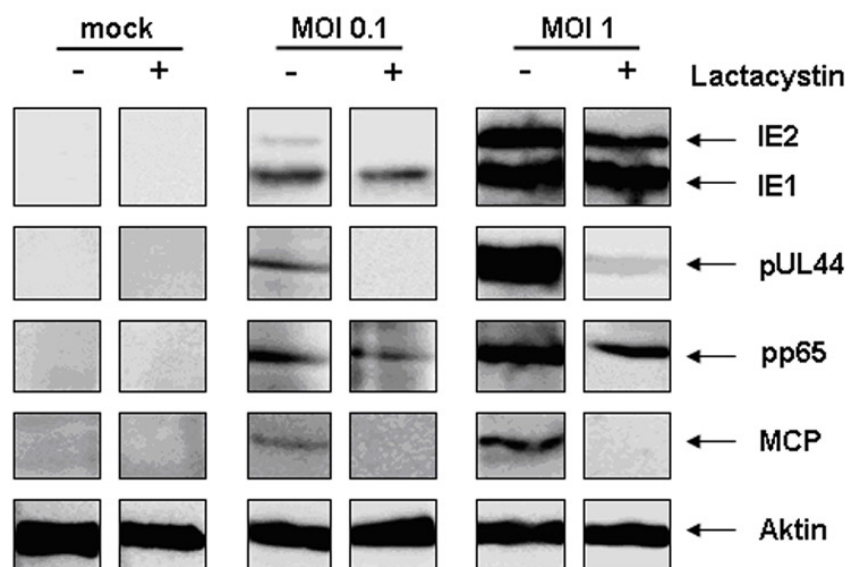


Abb. 25: Western Blot-Analyse der viralen Proteinexpression in PI-behandelten HELF. Nichtinfizierte (mock) oder mit HCMV AD169 infizierte HELF (MOI 0.1, 0.25, 0.5, 1 oder 2) wurden mit **(A)** 0.5 μ M MG132 oder **(B)** 20 μ M Lactacystin bzw. dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels behandelt. Die Zellen wurden 72 h p.i. für die Gewinnung von Zellextrakten geerntet. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembranen erfolgte der Immunoblot mit Antikörpern gegen HCMV IE1/2, pUL44, pp65 und MCP. Die gleichmäßige Beladung der SDS-Gele wurde mit einer Färbung der Membranen gegen das zelluläre Protein Aktin überprüft. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von jeweils drei unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse aus den Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen zeigten, dass PI die Expression einzelner viraler Proteine unterschiedlich stark beeinflussen. Während die Expression von IE1 und IE2 nur bei niedriger MOI signifikant durch PI gehemmt wurde, war die Expression einer Vielzahl von frühen und späten Proteinen auch bei hoher MOI sensitiv für die Inhibition der Proteasomaktivität. Da späte Proteine wie beispielsweise MCP unverzichtbar für die Bildung der Viruspartikel sind, erklärt die vollständige Hemmung dieser Proteine durch MG132 bzw. Lactacystin somit auch die Abwesenheit von Kapsiden bzw. Virionen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen PI-behandelter Zellen (vergleiche Abschnitt 3.2.4).

Auffallend bei den Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen war, dass Lactacystin die virale Proteinexpression nicht in gleichem Maße wie MG132 supprimierte, obwohl Lactacystin das Proteasom irreversibel hemmt und die CT-L Proteasomaktivität durch 20 μ M Lactacystin stärker inhibiert wurde als durch 0.5 μ M MG132 (siehe Abb. 16). Diese zunächst widersprüchlich erscheinende Beobachtung kann jedoch durch eine Studie von Meiners *et al.* erklärt werden, wonach eine starke Hemmung der Proteasomaktivität die *de novo* Synthese von Proteasomen induziert [Meiners, 2003]. Infolge der Neusynthese von Proteasomen würde somit auch die Proteasomaktivität in Zelllysaten wieder ansteigen.

Um der Frage nachzugehen, ob dieser zelluläre Schutzmechanismus für die geringere Effizienz von Lactacystin bezüglich der Hemmung der viralen Proteinexpression verantwortlich gemacht werden kann, sollte die CT-L Proteasomaktivität in Lactacystin-behandelten HELF über einen Zeitraum von 72 h untersucht werden. Da es sich bei Lactacystin um einen irreversiblen Inhibitor handelt, könnte ein Anstieg der Proteasomaktivität nur durch die Neusynthese von Proteasomen erklärt werden.

Für den Versuch wurden HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) mit 0.5 µM MG132, 20 µM Lactacystin oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels inkubiert. Die Zellen wurden 0, 24, 48 oder 72 h nach Zugabe der Inhibitoren geerntet. Die Bestimmung der CT-L Proteasomaktivität in Zellextrakten erfolgte mit Hilfe eines Fluorometers unter Verwendung der KC4 Software (BioTek Instruments).

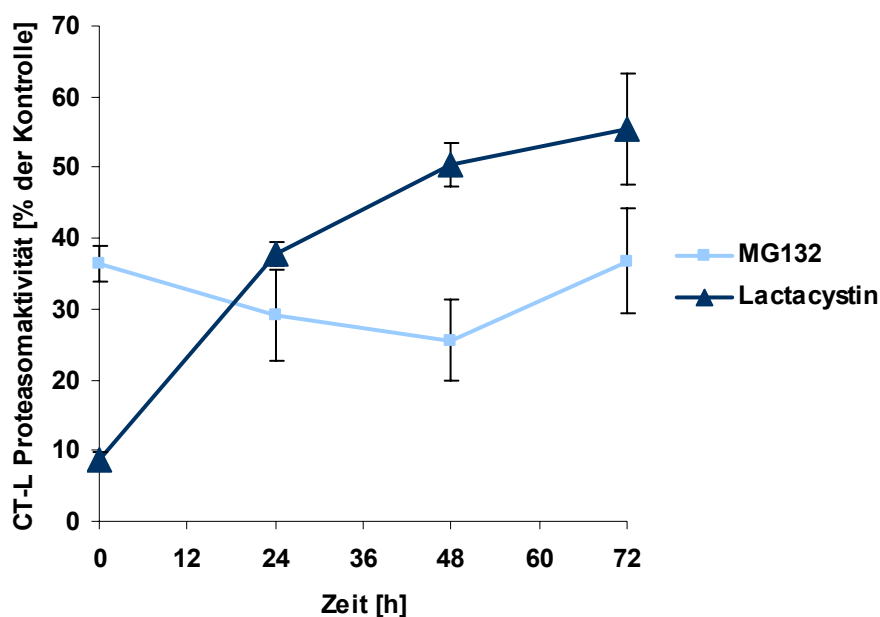


Abb. 26: Kinetik der CT-L Proteasomaktivität in PI-behandelten HELF. HELF wurden mit 0.5 µM MG132 bzw. 20 µM Lactacystin inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Lösungsmittels inkubiert wurden. Die CT-L Proteasomaktivität wurde 0, 24, 48 und 72 h nach Zugabe der Inhibitoren in Zellextrakten gemessen. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunkts aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie Abbildung 26 zeigt, war die CT-L Proteasomaktivität in HELF direkt nach der Zugabe von 20 µM Lactacystin (Zeitpunkt 0 h) um ca. 90% im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Bereits 24 h nach Zugabe des Inhibitors war die CT-L Aktivität jedoch nur noch um ca. 60% verringert. 72 h nach Zugabe von Lactacystin war die CT-L Aktivität schließlich auf ca. 55% der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle angestiegen. Im Gegensatz dazu war die CT-L Proteasomaktivität direkt nach der Zugabe von 0.5 µM MG132 (Zeitpunkt 0 h) nur um ca. 64% im Vergleich zur Kontrolle inhibiert (siehe Abb. 26). Bis 48 h

nach Zugabe von MG132 sank die CT-L Aktivität auf ca. 30% im Vergleich zur Kontrolle ab. Erst nach 72 h stieg die CT-L Aktivität wieder leicht an.

Die Hemmung des Proteasoms durch MG132 ist reversibel, woraus der beobachtete leichte Anstieg der CT-L Aktivität 72 h nach Zugabe des Inhibitors resultiert. Lactacystin ist hingegen ein irreversibler Inhibitor. Somit kann die bereits 24 h nach Zugabe von Lactacystin beobachtete Zunahme der CT-L Aktivität nur durch die Neusynthese von Proteasomen erklärt werden.

3.2.7.3 Analyse der Verzögerung der HCMV-Proteinexpression

In Studien von Prösch *et al.* wurde postuliert, dass die Expression der IE-Proteine in PI-behandelten HELF nicht nur reduziert, sondern auch zeitlich verschoben ist [Prösch, 2003]. Um auszuschließen, dass PI die virale Proteinexpression lediglich verzögern anstatt permanent zu reprimieren, sollte die HCMV-Proteinexpression in behandelten und unbehandelten HELF 120 h p.i. charakterisiert werden.

Dazu wurden Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 0.1 bzw. 1 infizierter HELF in 24 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 1×10^5 /Well) mit 0.5 μ M MG132 oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert. Da MG132 das Proteasom reversibel hemmt (vergleiche Abb. 26), wurde der Inhibitor 72 h p.i. erneut zugegeben. Die Zellen wurden 120 h p.i. fixiert und mit Primärantikörpern gegen die viralen Proteine IE1, IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56, pUL89, pp65, gB, MCP und pp28 inkubiert (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Nach Inkubation mit anti-Maus (IE1, IE2, pUL112/113, pUL44, pp65, gB, MCP, pp28) bzw. anti-Human (pUL56, pUL89) Cy3-konjugierten F(ab')₂ Fragmenten und Färbung der Zellkerne mittels DAPI wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert und unter Verwendung einer Digitalkamera sowie der Cell D Software (Olympus) fotografiert.

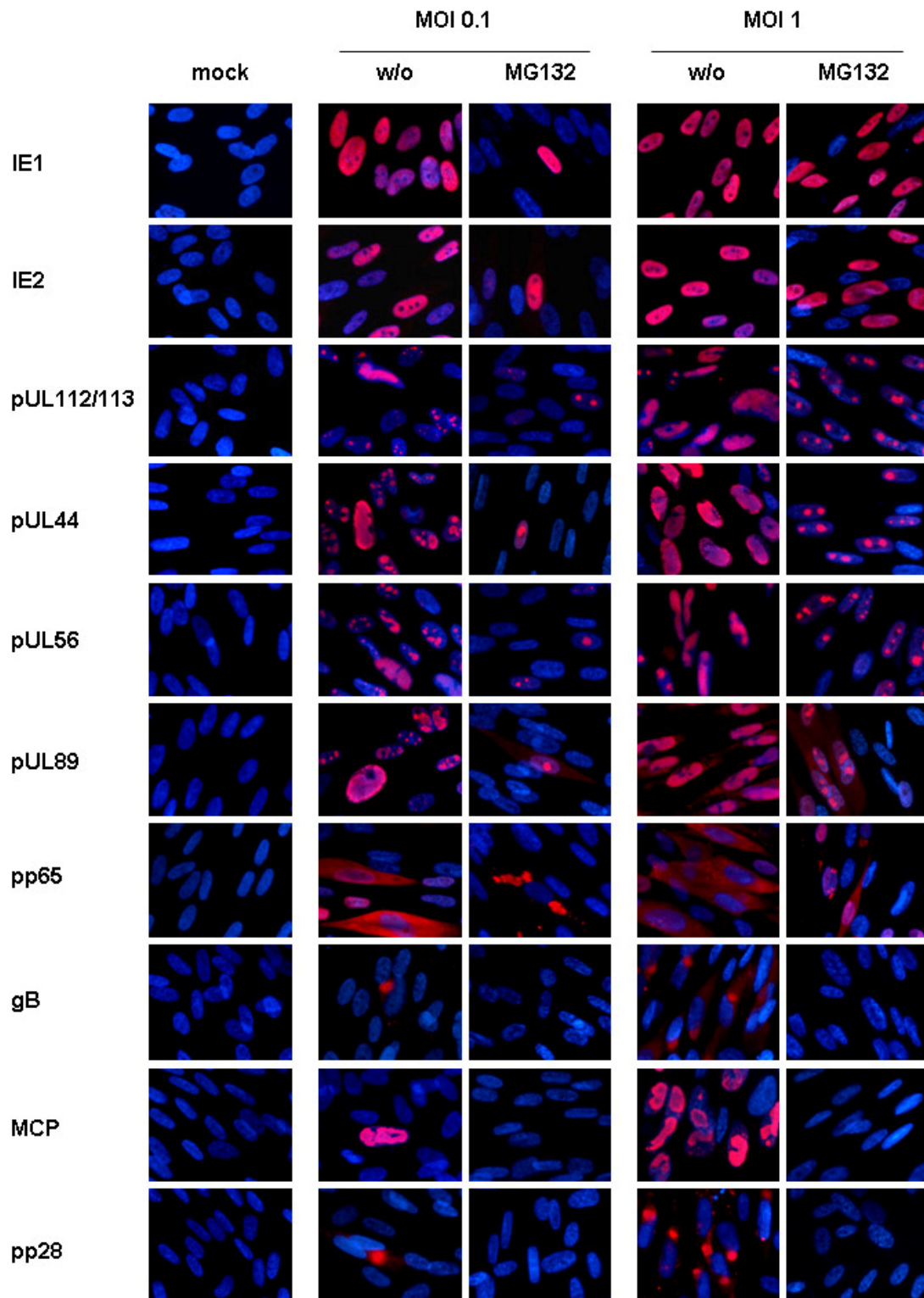


Abb. 27: Virale Proteinexpression 120 h p.i. in MG132-behandelten und unbehandelten HELF. Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit HCMV AD169 infizierter HELF (MOI 0.1 bzw. 1) wurden mit 0.5 μ M MG132 bzw. dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) inkubiert. Die Zellen wurden 120 h p.i. für eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen die viralen Proteine IE1, IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56, pUL89, pp65, gB, MCP und pp28 fixiert. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen.

Die Immunfluoreszenzanalysen zum Zeitpunkt 120 h p.i. lieferten keinen Hinweis darauf, dass MG132 eine Verzögerung der viralen Proteinexpression bewirkt. Wie aus Abbildung 27 ersichtlich wird, war kein Unterschied bezüglich des Effekts von MG132 auf die Expression der viralen Proteine im Vergleich zum Zeitpunkt 72 h p.i. erkennbar (vergleiche Abb. 24 A). Die Expression der sehr frühen Proteine IE1 und IE2 war auch 120 h p.i. MOI-abhängig reprimiert. Im Gegensatz zum Zeitpunkt 72 h p.i. zeigte IE2 jedoch keine Lokalisation in Replikationszentren, sondern war diffus im Kern verteilt. Möglicherweise gibt es bislang noch unbekannte Prozesse, die eine Umverteilung von IE2 zum Zeitpunkt 120 h p.i. bewirken. Die Aufnahmen dokumentieren weiterhin, dass die frühen Proteine pUL112/113, pUL44, pUL56 und pUL89 in MG132-behandelten HELF MOI-unabhängig in Prä-Replikationszentren lokalisiert waren. Das *early late*-Protein pp65 akkumulierte in MG132-behandelten Zellen MOI-unabhängig in perinukleären Aggregaten. Wie bereits unter Abschnitt 3.2.7 beobachtet, unterdrückte MG132 die späte virale Proteinexpression vollständig. Auch 120 h p.i. konnten weder gB noch MCP oder pp28 in MG132-behandelten Zellen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigten die Versuche, dass MG132 keine Verzögerung der viralen Proteinexpression bewirkt, sondern diese stattdessen dauerhaft supprimiert.

3.2.8 Einfluss von MG132 auf die Spaltung der konkatemeren HCMV-DNA

Mit dem Ziel, den Einfluss von MG132 auf die Spaltung der konkatemeren HCMV-DNA durch die virale Terminase zu untersuchen, sollte die Struktur der HCMV-DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) analysiert werden.

Dazu wurden nichtinfizierte (mock) oder mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 1 infizierte HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) mit steigenden Konzentrationen von MG132 (0.05–0.50 µM) inkubiert. Als Kontrolle dienten infizierte Zellen, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert wurden. Die Zellen wurden 72 h p.i. für

die Isolierung und Einbettung der DNA in Agarose-Blöckchen geerntet (siehe Abschnitt 2.2.2.5). Die Auftrennung der DNA erfolgte mittels PFGE über 27 h bei 14°C und 150 V/cm (Pulswinkel 120°, Pulszeit 15-110 s). Im Anschluss wurde das Gel für 1 h mit 1 µg/ml Ethidiumbromid inkubiert. Die angefärbte DNA wurde unter Verwendung eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und fotografiert. Die Größe der HCMV-Monomere (240 kb) wurde mittels Lambda Ladder PFG Marker bestimmt.

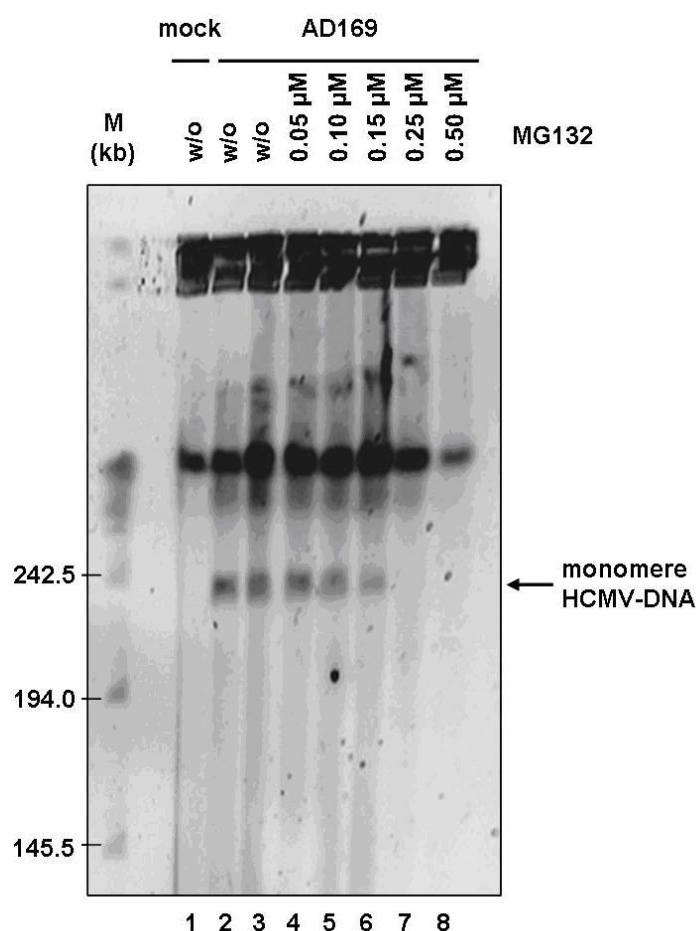


Abb. 28: Einfluss von MG132 auf die Spaltung der konkatemeren viralen DNA. Nichtinfizierte (mock) oder mit HCMV AD169 infizierte HELF (MOI 1) wurden in Abwesenheit (w/o) oder Anwesenheit von 0.05, 0.10, 0.15, 0.25 oder 0.50 µM MG132 kultiviert. Die Zellen wurden 72 h p.i. für eine Auftrennung der DNA mittels PFGE geerntet. Die Größe der HCMV-Monomere (240 kb) wurde mittels Lambda Ladder PFG Marker bestimmt. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen.

Wie aus Abbildung 28 hervorgeht, erfolgte die Spaltung der konkatemeren HCMV-DNA in Anwesenheit von MG132 bis zu einer Konzentration von 0.15 µM (Spur 4-6). Bei höheren Konzentrationen von MG132 (≥ 0.25 µM)

konnte jedoch keine monomere HCMV-DNA detektiert werden (Abb. 28, Spur 7-8).

Diese Experimente zeigten somit, dass MG132 mit der Spaltung der konkatemeren viralen DNA interferiert und diese ab einer Konzentration von 0.25 μM komplett unterdrückt.

3.2.9 Einfluss von MG132 auf die virale DNA-Synthese

Aus den Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen ging hervor, dass PI die Expression der frühen Proteine pUL112/113 und pUL44, die essentiell für die Replikation der HCMV-DNA sind [Pari, 1993; Yamamoto, 1998], hemmen und die Bildung von viralen Replikationszentren unterdrücken.

Um daher zu untersuchen, ob die virale DNA-Replikation in Anwesenheit von PI überhaupt stattfindet, wurden Studien mit dem Nukleosidanalogen Bromdesoxyuridin (BrdU) durchgeführt. Aufgrund des *virus host shutoff* in HCMV-infizierten Zellen wird BrdU vornehmlich in neusynthetisierte virale DNA eingebaut [Morin, 1996], die somit über eine Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht werden kann.

Für den Versuch wurden Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 1 infizierter HELF in 24 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 1×10^5 /Well) mit steigenden Konzentrationen von MG132 (0.05-0.50 μM) oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt. Die Zugabe von 10 μM BrdU erfolgte 45 h p.i.. Nach Fixierung der Zellen 72 h p.i. wurde die DNA in 2 N HCl für 30 min bei 37°C denaturiert. Anschließend wurde die Säure in 1x TBE neutralisiert. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.2.2.4) erfolgte mit Hilfe eines Primärantikörpers gegen BrdU und anti-Maus Cy3-konjugierten F(ab')₂ Fragmenten als Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops sowie der LSM510 Meta Software (Carl Zeiss) unter Verwendung einer Digitalkamera.

In infizierten, unbehandelten Zellen zeigte BrdU eine Lokalisation in viralen Replikationszentren (siehe Abb. 29). Da BrdU nur in die neusynthetisierte HCMV-DNA inkorporiert wird, zeigt dieses Verteilungsmuster die ablaufende

virale DNA-Replikation an. Mit steigenden Konzentrationen von MG132 verringerte sich zum einen die Anzahl der BrdU-positiven Zellen. Zum anderen beschränkten sich die BrdU-gefärbten Areale des Zellkerns zunehmend auf kleine, punktförmige Bereiche (siehe Abb. 29). Bei einer Konzentration von 0.5 μ M MG132 konnte keine neusynthetisierte virale DNA detektiert werden. In ruhenden, nichtinfizierten Zellen wurde BrdU nicht in die zelluläre DNA inkorporiert.

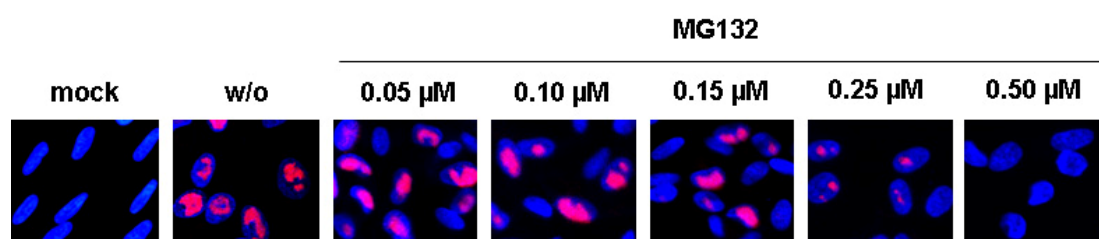


Abb. 29: Analyse der viralen DNA-Replikation. Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit HCMV AD169 infizierter HELF (MOI 1) wurden mit steigenden Konzentrationen von MG132 (0.05-0.50 μ M) bzw. mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) inkubiert. 45 h p.i. erfolgte die Zugabe von 10 μ M BrdU. Die Zellen wurden für weitere 27 h kultiviert und anschließend fixiert. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit einem Antikörper gegen BrdU (mAb α -BrdU). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen.

Diese Experimente zeigten, dass MG132 die *de novo* Synthese viraler DNA inhibiert. Infolgedessen können *true late*-Proteine wie MCP und pp28 nicht mehr gebildet werden, da die vollständig abgeschlossene DNA-Replikation eine Voraussetzung für die Expression dieser Proteine ist (vergleiche Abschnitt 1.4.2). Dieses Experiment lieferte somit eine Erklärung für den in den Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen beobachteten vollständigen Block der späten viralen Proteinexpression.

3.3 Untersuchungen zum Mechanismus des anti-HCMV-Effekts von PI

3.3.1 Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Der HCMV MIE-Enhancer/Promotor weist neben einer Vielzahl anderer Bindungsmotive auch vier Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NF- κ B

auf. Im gesamten viralen Genom wurden abgesehen davon bislang nur im US3-Promotor weitere putative Bindestellen für NF- κ B beschrieben [Chan, 1996]. Die Bedeutung der Bindung von NF- κ B an den MIE-Enhancer/Promotor für die Initiation der viralen Proteinexpression wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnten DeMeritt *et al.* zeigen, dass die Aktivierung von NF- κ B essentiell für die effiziente Transaktivierung des MIE-Enhancer/Promotors ist [DeMeritt, 2004]. Zudem spielt NF- κ B eine zentrale Rolle bei der TNF- α vermittelten Stimulation des MIE-Enhancer/Promotors in monozytären HL60-Zellen [Prösch, 1995]. Hingegen demonstrierte eine Studie von Gustems *et al.*, dass HCMV-Mutanten, bei welchen die Bindestellen für NF- κ B im MIE-Enhancer/Promotor deletiert wurden, ebenfalls replikationskompetent sind [Gustems, 2006].

PI blockieren die Aktivierung von NF- κ B, indem sie I- κ B stabilisieren (siehe Abschnitt 1.5.2). Die PI-vermittelte Hemmung der Aktivierung von NF- κ B und Stabilisierung von I- κ B in HCMV-infizierten und nichtinfizierten HELF war bereits zuvor in der Arbeitsgruppe gezeigt worden [Prösch, 2003]. NF- κ B wird somit im Zytoplasma zurückgehalten und kann nicht mehr an den MIE-Enhancer/Promotor binden. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob PI ihre antivirale Wirkung gegenüber HCMV durch die Hemmung der Aktivierung von NF- κ B entfalten.

3.3.1.1 Einfluss von MG132 auf die IE1/2-Expression in RPE-Zellen

Retinale Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) sind neben HELF ein wichtiges Zellkultursystem für HCMV und dienen als Modell für die HCMV-vermittelte Retinitis. Im Vergleich zu Fibroblasten läuft der virale Replikationszyklus in RPE-Zellen zeitlich verzögert ab [Adair, 2006; Detrick, 1996]. Laut einer Studie von Cinatl Jr *et al.* ist die Virusreplikation in RPE-Zellen nicht von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B abhängig und kann nicht durch NF- κ B Inhibitoren gehemmt werden [Cinatl Jr, 2001]. Um einen ersten Hinweis darauf zu erhalten, ob der anti-HCMV-Effekt von PI auf der Hemmung von NF- κ B beruht, sollte der Einfluss von MG132 auf die

Expression von IE1 und IE2 in RPE-Zellen unabhängig vom Kontext des gesamten viralen Genoms untersucht werden. Für den Versuch wurde das Plasmid pG305 eingesetzt, welches für die HCMV IE1/2 Exons 1-5 unter der Kontrolle des MIE-Enhancer/Promotors kodiert (schematische Darstellung siehe 2.1.4).

Deckglaskulturen von RPE-Zellen in 12 Well Zellkulturplatten mit einer Konfluenz von 60-80% (Zellzahl: 3×10^5 - 4×10^5 /Well) wurden mit 3 µg des Plasmids pG305 pro Well transient transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.1.7) und anschließend mit 0.5 µM MG132 inkubiert. Als Kontrolle dienten transfizierte Zellen, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert wurden. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert. Für die anschließende indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden Primärantikörper gegen IE1 oder IE2 sowie anti-Maus Cy2-konjugierte F(ab')₂ Fragmente als Sekundärantikörper eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Die Quantifizierung der IE1- bzw. IE2-positiven Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung. Pro Ansatz wurden zwanzig Gesichtsfelder ausgezählt. Die Anzahl IE1- bzw. IE2-positiver Zellen der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle wurde 100% gesetzt.

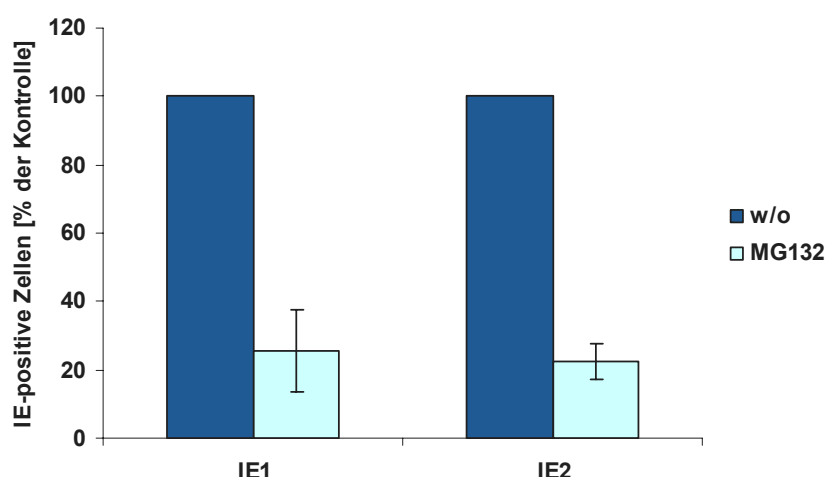


Abb. 30: Einfluss von MG132 auf die IE1/2-Expression in transient transfizierten RPE-Zellen. Deckglaskulturen von RPE-Zellen wurden mit dem Plasmid pG305 transient transfiziert und mit 0.5 µM MG132 oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) inkubiert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen HCMV IE1 (mAb p63-27) oder IE2 (mAb SMX) fixiert und anschließend am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie aus Abbildung 30 hervorgeht, wurde die Expression von IE1 und IE2 durch MG132 um 75% (IE1) bzw. 78% (IE2) im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle gehemmt. Um auszuschließen, dass die IE1/2-Expression in RPE-Zellen aufgrund der Zytotoxizität von MG132 gehemmt war, wurde die CC_{50} mittels XTT Assay (siehe Abschnitt 2.2.1.8) bestimmt. Die CC_{50} für MG132 in RPE-Zellen betrug $4.55 \pm 1.05 \mu\text{M}$ und lag damit ca. 10fach über der Arbeitskonzentration. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die signifikante Hemmung der IE1/2-Expression in RPE-Zellen nicht durch zytotoxische Nebeneffekte von MG132 bedingt wurde.

Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass die HCMV-Replikation in RPE-Zellen nicht durch NF- κ B Inhibitoren gehemmt werden kann [Cinatl Jr, 2001] sowie der Tatsache, dass MG132 ein NF- κ B Inhibitor ist und dennoch die IE1/2-Expression in RPE-Zellen signifikant hemmt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass dem anti-HCMV-Effekt von PI ein anderer Mechanismus als die Hemmung von NF- κ B zugrunde liegt.

3.3.1.2 Einfluss von SN50 auf die HCMV-Replikation

In Fortsetzung dieser Experimente sollte die Rolle von NF- κ B im Hinblick auf den anti-HCMV-Effekt von PI mit Hilfe von SN50 (siehe Abschnitt 2.1.9.3) weiter untersucht werden. SN50 ist ein zellpermeables Peptid, welches die Kernlokalisationssequenz der NF- κ B Untereinheit p50 trägt. SN50 erlaubt zwar die Aktivierung von NF- κ B, konkurriert jedoch mit diesem um essentielle Kernimportfaktoren [Lin, 1995]. Somit wird NF- κ B durch SN50 – ähnlich wie durch PI – im Zytoplasma zurückgehalten. Gesetzt den Fall, dass der anti-HCMV-Effekt von PI auf der Hemmung der NF- κ B Aktivierung und somit der Abwesenheit von NF- κ B im Zellkern beruht, so sollte SN50 eine vergleichbare Auswirkung wie PI auf die HCMV-Replikation haben.

Für den Versuch wurden HELF in 12 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: $5 \times 10^5/\text{Well}$) mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 0.001 infiziert und mit steigenden Konzentrationen von SN50 (5-50 $\mu\text{g/ml}$) oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert. Nach Fixierung der Zellen am Tag 7 p.i. wurde die Bildung von Plaques mittels immunozytochemischer Färbung gegen das virale Protein IE1 analysiert (siehe

Abschnitt 2.2.1.6). Als Sekundärantikörper diente ein anti-Maus IgG HRP-Konjugat. Die Quantifizierung der Plaques erfolgte am Lichtmikroskop. Die Plaquezahl pro Well der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle wurde 100% gesetzt.

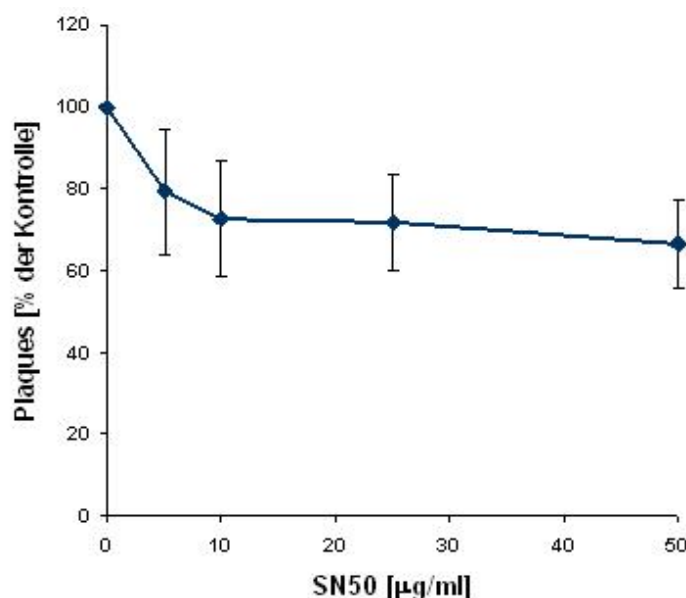


Abb. 31: Einfluss von SN50 auf die HCMV-Replikation. HELF wurden mit HCMV AD169 infiziert (MOI 0.001) und mit steigenden Konzentrationen von SN50 (5-50 µg/ml) bzw. dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert. Nach Fixierung der Zellen am Tag 7 p.i. und immunzytochemischer Färbung gegen HCMV IE1 (mAb p63-27) wurde die Anzahl der Plaques mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus vier unabhängigen Experimenten.

Wie aus Abbildung 31 hervorgeht, war die HCMV-Replikation in Anwesenheit von SN50 zwar leicht beeinträchtigt, konnte jedoch nicht vollständig unterdrückt werden. Selbst bei einer Konzentration von 50 µg/ml SN50, bei welcher der NF-κB Kernimport komplett blockiert ist (siehe unten), war die Plaquezahl nur um ca. 30% im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle reduziert. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass sich NF-κB zwar günstig auf die HCMV-Replikation auswirkt, die Replikation jedoch auch in Abwesenheit von NF-κB abzulaufen scheint.

Um zu testen, ob die HCMV-Replikation in Anwesenheit von SN50 sensitiv für PI ist, wurden Plaquereduktionsassays mit MG132 durchgeführt. Sofern die Abwesenheit von NF-κB im Kern (durch Hemmung der Aktivierung) für den

antiviralen Effekt von PI verantwortlich ist, sollte die HCMV-Replikation in Anwesenheit von SN50 weniger sensitiv gegenüber MG132 sein.

HELFL in 12 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 5×10^5 /Well) wurden mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 0.001 infiziert und in Abwesenheit oder Anwesenheit von 50 $\mu\text{g/ml}$ SN50 mit steigenden Konzentrationen von MG132 (0.1-0.5 μM) inkubiert. Als Kontrolle dienten infizierte HELFL, die mit den entsprechenden Volumina der Lösungsmittel inkubiert wurden. Am Tag 7 p.i. wurden die Zellen fixiert. Anschließend erfolgte die immunzytochemische Färbung gegen das virale Protein IE1 unter Verwendung eines anti-Maus IgG HRP-konjugierten Sekundärantikörpers (siehe Abschnitt 2.2.1.6). Die Plaques wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops quantifiziert. Die Plaquezahl pro Well der Kontrolle wurde jeweils 100% gesetzt. Die IC_{50} wurde graphisch bestimmt.

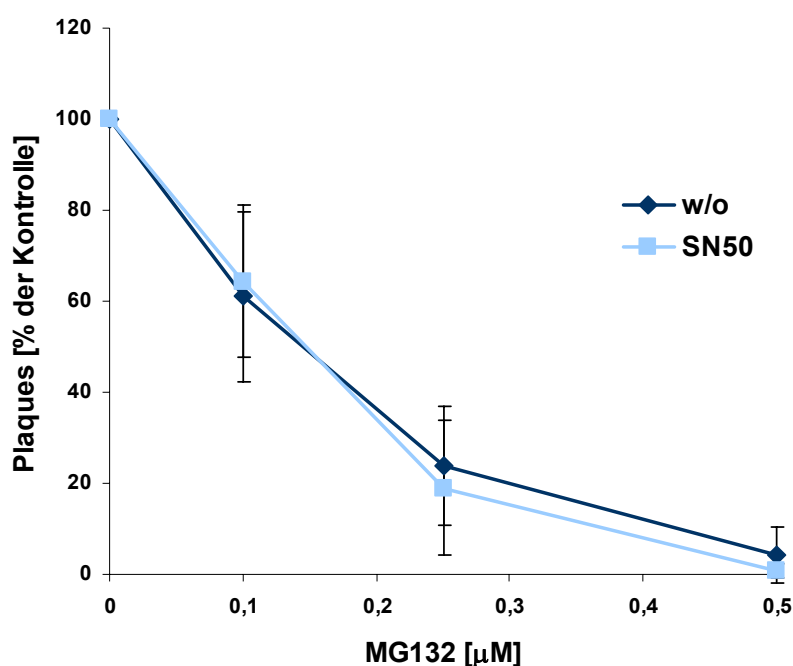


Abb. 32: Sensitivität der HCMV-Replikation gegenüber MG132 in SN50-behandelten HELFL. HELFL wurden mit HCMV AD169 infiziert (MOI 0.001) und in Abwesenheit (w/o) oder Anwesenheit von 50 $\mu\text{g/ml}$ SN50 mit steigenden Konzentrationen von MG132 (0.1-0.5 μM) inkubiert. Als Kontrolle dienten infizierte HELFL, die mit den entsprechenden Volumina der Lösungsmittel inkubiert wurden. Nach Fixierung der Zellen am Tag 7 p.i. und immunzytochemischer Färbung gegen HCMV IE1 (mAb p63-27) wurde die Anzahl der Plaques mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus vier unabhängigen Experimenten.

Die IC_{50} für MG132 lag in Abwesenheit von SN50 bei $0.18 \pm 0.09 \mu M$. In Anwesenheit von SN50 betrug die IC_{50} $0.15 \pm 0.1 \mu M$. Die virale Replikation war somit sensitiv gegenüber MG132, unabhängig davon, ob die Zellen mit SN50 behandelt wurden (siehe Abb. 32).

Um die Wirksamkeit von SN50 nachzuweisen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Dazu wurden Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit dem Laborstamm AD169 infizierter HELF (MOI 1) in 24 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 1×10^5 /Well) mit 50 $\mu g/ml$ SN50 oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert. Die Zellen wurden 24 h p.i. fixiert und mit einem Primärantikörper gegen die NF- κB Untereinheit p50 gefärbt (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Zum Nachweis der HCMV-Infektion wurden parallel infizierte Zellen (MOI 1) mit einem Primärantikörper gegen das virale Protein IE1 inkubiert (zugehörige Daten nicht gezeigt). Nach Inkubation mit anti-Maus Cy3-konjugierten $F(ab')_2$ Fragmenten als Sekundärantikörper und Färbung der Zellkerne mittels DAPI wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert und unter Verwendung einer Digitalkamera sowie der Cell D Software (Olympus) fotografiert.

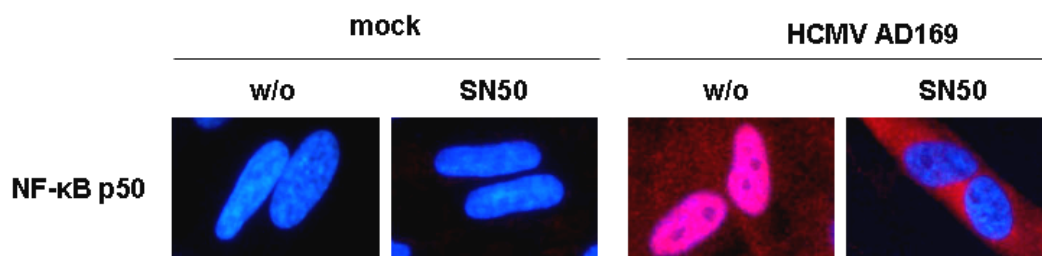


Abb. 33: Einfluss von SN50 auf die Lokalisation von NF- κB . Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit HCMV AD169 infizierter HELF (MOI 1) wurden mit 50 $\mu g/ml$ SN50 oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) inkubiert. Die Zellen wurden 24 h p.i. fixiert. Anschließend erfolgte die indirekte Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines Primärantikörpers gegen NF- κB p50. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen.

Wie aus Abbildung 33 ersichtlich ist, konnte NF- κB in nichtinfizierten Zellen weder im Zellkern noch im Zytoplasma detektiert werden. In diesen (unstimulierten) Zellen liegt NF- κB in äußerst geringen Mengen im Komplex mit I- κB im Zytoplasma vor und ist mittels Immunfluoreszenz nicht

nachweisbar. Durch Infektion von HELF mit HCMV wird die Aktivierung von NF- κ B induziert [Yurochko, 1997]. In Übereinstimmung damit war NF- κ B in HCMV-infizierten HELF im Zellkern lokalisiert (siehe Abb. 33). Die HCMV-vermittelte Translokation von NF- κ B in den Zellkern war in Anwesenheit von 50 μ g/ml SN50 vollständig aufgehoben. SN50-behandelte, infizierte Zellen zeigten jedoch eine diffuse zytoplasmatische Färbung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich aktiviertes NF- κ B im Zytoplasma anhäuft, da der Kernimport durch SN50 effizient unterdrückt wird.

Zusammenfassend erhärteten die Versuche mit SN50 weiter die Hypothese, dass der anti-HCMV-Effekt von PI unabhängig von der PI-vermittelten Hemmung der NF- κ B Aktivierung ist.

3.3.1.3 Charakterisierung der HCMV Mutante HB5 Δ NF- κ B

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde die Mutante HB5 Δ NF- κ B von S. Prösch und A. Zimmermann (Institut für Virologie der Universität Düsseldorf) mittels BAC-Mutagenese konstruiert, bei welcher alle vier NF- κ B Bindestellen im MIE-Enhancer/Promotor deletiert sind. Gesetzt den Fall, dass die Hemmung der Aktivierung von NF- κ B für den antiviralen Effekt von PI verantwortlich ist, so sollte die Mutante weniger sensitiv gegenüber MG132 sein als das Wildtyp-BAC. Die PI-Sensitivität von HB5 Δ NF- κ B sollte daher mittels Plaquereduktionsassays sowie EM- und Immunfluoreszenzanalysen charakterisiert werden.

Einfluss von MG132 auf die Replikation der HCMV Mutante HB5 Δ NF- κ B

HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) wurden mit dem Wildtyp-BAC HB5 oder der Mutante HB5 Δ NF- κ B mit einer MOI von 0.001 infiziert und mit steigenden Konzentrationen von MG132 (0.05-0.5 μ M) inkubiert. Als Kontrolle dienten infizierte Zellen, die mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert wurden. Da die Wirkung von MG132 reversibel ist, wurde der Inhibitor an den Tagen 3 und 5 p.i. erneut zugegeben. Am Tag 7 p.i. wurden die Zellen fixiert und eine immu-

zytochemische Färbung mit einem Primärantikörper gegen IE1/2 durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.1.6). Als Sekundärantikörper diente ein anti-Maus IgG HRP-Konjugat. Die Auszählung der Plaques erfolgte am Lichtmikroskop. Die Plaquezahl pro Flasche der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle wurde jeweils 100% gesetzt. Die IC_{50} wurde graphisch bestimmt.

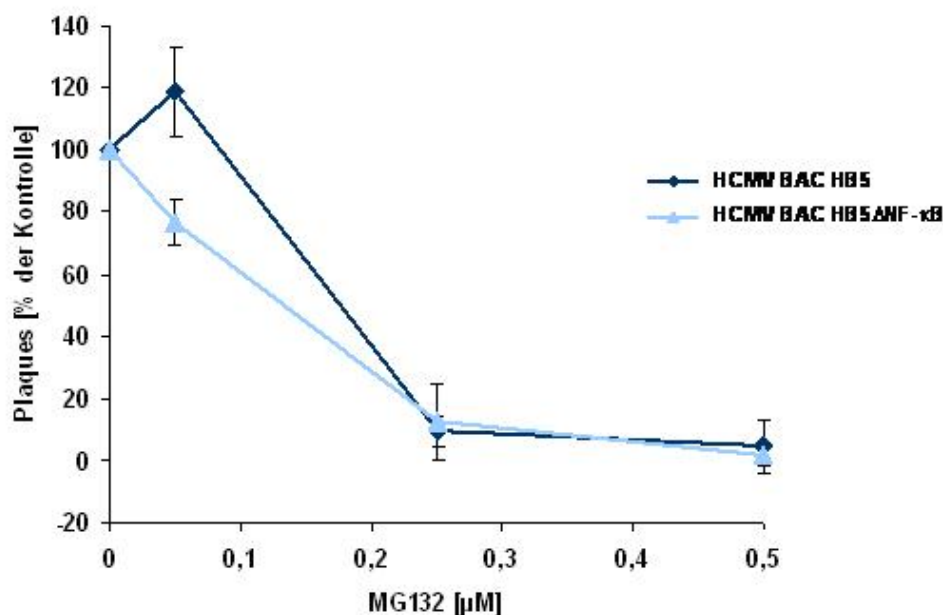


Abb. 34: Einfluss von MG132 auf die Replikation der HCMV Mutante HB5ΔNF-κB. HELF wurden mit dem HCMV Wildtyp-BAC HB5 bzw. der Mutante HB5ΔNF-κB infiziert (MOI 0.001) und mit steigenden Konzentrationen von MG132 (0.05-0.5 µM) bzw. dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert. Nach Fixierung der Zellen am Tag 7 p.i. und immunzytochemischer Färbung gegen HCMV IE1/2 (mAb E13) wurde die Anzahl der Plaques pro 25 cm² Zellkulturflasche mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (± Standardabweichung) bezogen auf die Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus vier unabhängigen Experimenten.

Wie aus Abbildung 34 hervorgeht, wurde die Replikation des Wildtyps und der Mutante konzentrationsabhängig durch MG132 gehemmt. Die IC_{50} -Werte für MG132 in HELF betrugen 0.18 ± 0.01 µM für HB5 bzw. 0.13 ± 0.03 µM für HB5ΔNF-κB. Somit ist die Replikation der Mutante HB5ΔNF-κB gegenüber MG132 in gleichem Maße sensitiv wie die Replikation des Wildtyps HB5.

EM-Analyse der HCMV Mutante HB5ΔNF-κB

Zur weiteren Charakterisierung der Mutante wurden HELF in 25 cm² Zellkulturflaschen (Zellzahl: 1x10⁶/Flasche) mit dem HCMV BAC HB5-GFP bzw. der Mutante HB5ΔNF-κB mit einer MOI von 0.1 infiziert und mit 0.5 μM MG132 oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels behandelt. Das HCMV BAC HB5-GFP wurde anstelle des nicht mehr verfügbaren Wildtyps HB5 eingesetzt und ist mit diesem bis auf eine eGFP-exprimierende Kassette zwischen den offenen Leserahmen *US1* und *US12* identisch (siehe Abschnitt 2.1.3). Die Zellen wurden 72 h p.i. geerntet und mit 2.5% (v/v) Glutaraldehyd fixiert. Nach Kontrastierung mit 0.1% (w/v) Tannin und Färbung mit 0.2% (w/v) Uranylacetat wurden die Zellen schließlich in Epon eingebettet (siehe Abschnitt 2.2.2.6). Anschließend wurden Ultradünnschnitte der Proben angefertigt, auf Kupfernetze übertragen und mit Hilfe eines TecnaiTM G2 Elektronenmikroskops (FEI Company) bei einer konstanten Spannung von 120 kV analysiert. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer 2K MegaView2-Digitalkamera bei kalibrierten Vergrößerungen.

In Übereinstimmung mit den in Abschnitt 3.2.4 gewonnenen Ergebnissen konnte die Bildung infektiöser Viruspartikel in MG132-behandelten Zellen, die mit dem HCMV BAC HB5-GFP infiziert worden waren, vollständig unterdrückt werden (siehe Abb. 35 A, B, C, D). Auch nicht-infektiöse Partikel wie beispielsweise NIEPs oder *dense bodies* wurden nicht detektiert. Die Ultradünnschnitte der mit der BAC-Mutante HB5ΔNF-κB infizierten, MG132-behandelten Zellen ließen ebenfalls eine völlige Abwesenheit infektiöser sowie nicht-infektiöser Viruspartikel erkennen (siehe Abb. 35 E, F, G, H).

Diese Versuche zeigten, dass die Bildung infektiöser Nachkommenviren der BAC-Mutante HB5ΔNF-κB ebenso sensitiv für die Hemmung des Proteasoms ist wie die des BAC HB5-GFP.

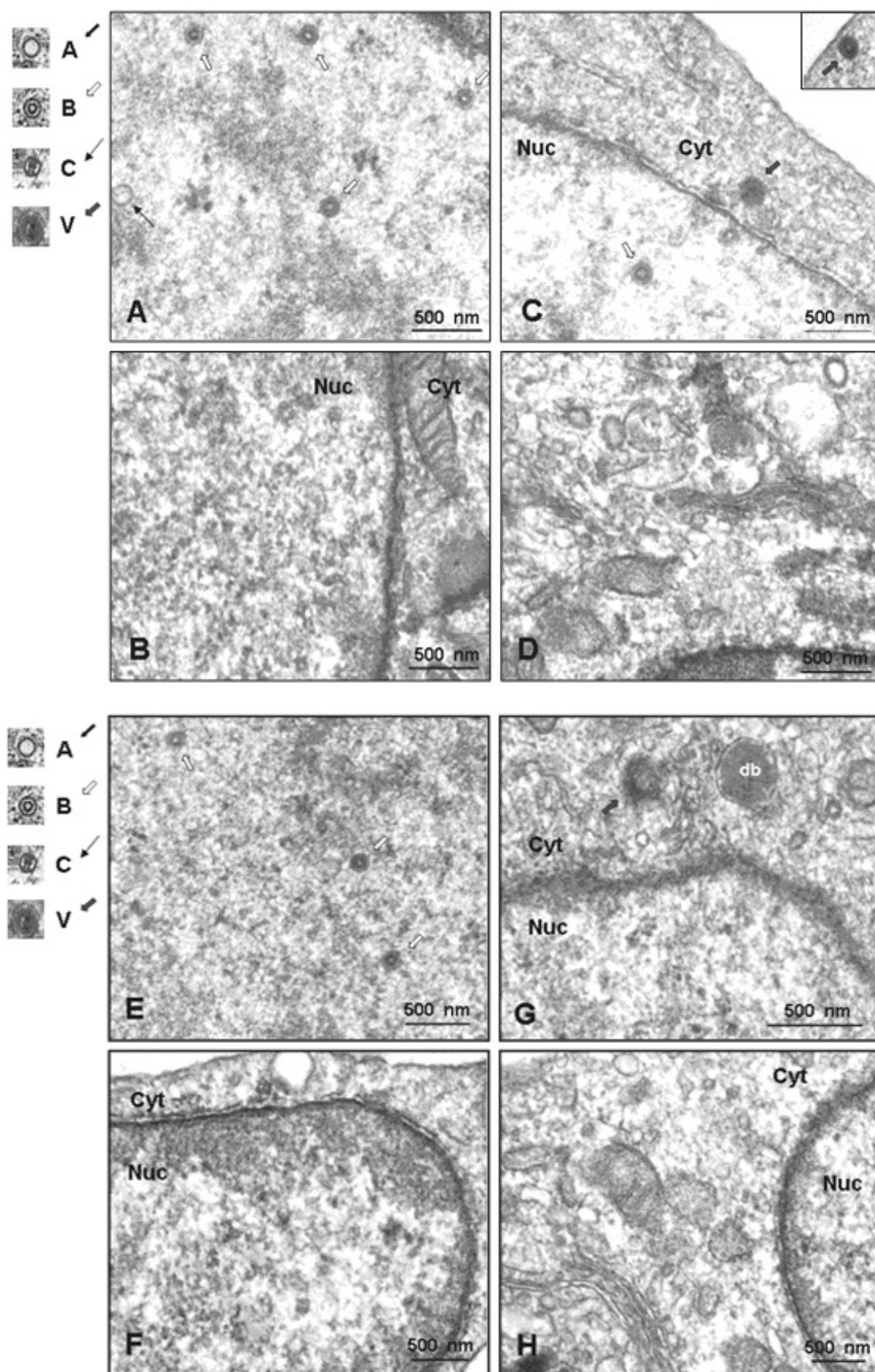


Abb. 35: Elektronenmikroskopische Analyse von Ultradünnschnitten HCMV BAC-infizierter HELF. HELF wurden mit dem HCMV BAC HB5-GFP (**A, B, C, D**) bzw. HB5 Δ NF- κ B (**E, F, G, H**) infiziert (MOI 0.1) und mit 0.5 μ M MG132 (**B, D, F, H**) oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (**A, C, E, G**) inkubiert. Die Zellen wurden 72 h p.i. mit 2.5% (v/v) Glutaraldehyd fixiert und eingebettet. **A, B, E** und **F** zeigen Ausschnitte aus dem Zellkern (Nuc); **C, D, G** und **H** zeigen Ausschnitte aus dem Zytoplasma (Cyt). A-Kapside sind durch breite schwarze Pfeile, B-Kapside durch weiße Pfeile und C-Kapside durch schmale schwarze Pfeile gekennzeichnet (siehe Legende). Virionen sind durch breite graue Pfeile dargestellt. Db bezeichnet *dense bodies*. Das Größenmaß entspricht 500 nm. Die Darstellung zeigt ein repräsentatives von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Einfluss von PI auf die Proteinexpression der HCMV Mutante HB5 Δ NF- κ B

Um aufzuklären, ob die Proteinexpression der BAC-Mutante ebenfalls von MG132 beeinflusst wird, wurden Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit dem HCMV BAC HB5-GFP bzw. der Mutante HB5 Δ NF- κ B mit einer MOI von 0.1 infizierter HELF in 24 Well Zellkulturplatten (Zellzahl: 1×10^5 /Well) mit 0.5 μ M MG132 oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels inkubiert. Die Zellen wurden 72 h p.i. fixiert und mit Primärantikörpern gegen die viralen Proteine IE1, IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56, pUL89, pp65, gB, MCP und pp28 gefärbt (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Nach Inkubation mit anti-Maus (IE1, IE2, pUL112/113, pUL44, pp65, gB, MCP, pp28) bzw. anti-Human (pUL56, pUL89) Cy3-konjugierten F(ab')₂ Fragmenten und Färbung der Zellkerne mittels DAPI wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert und unter Verwendung einer Digitalkamera sowie der Cell D Software (Olympus) fotografiert.

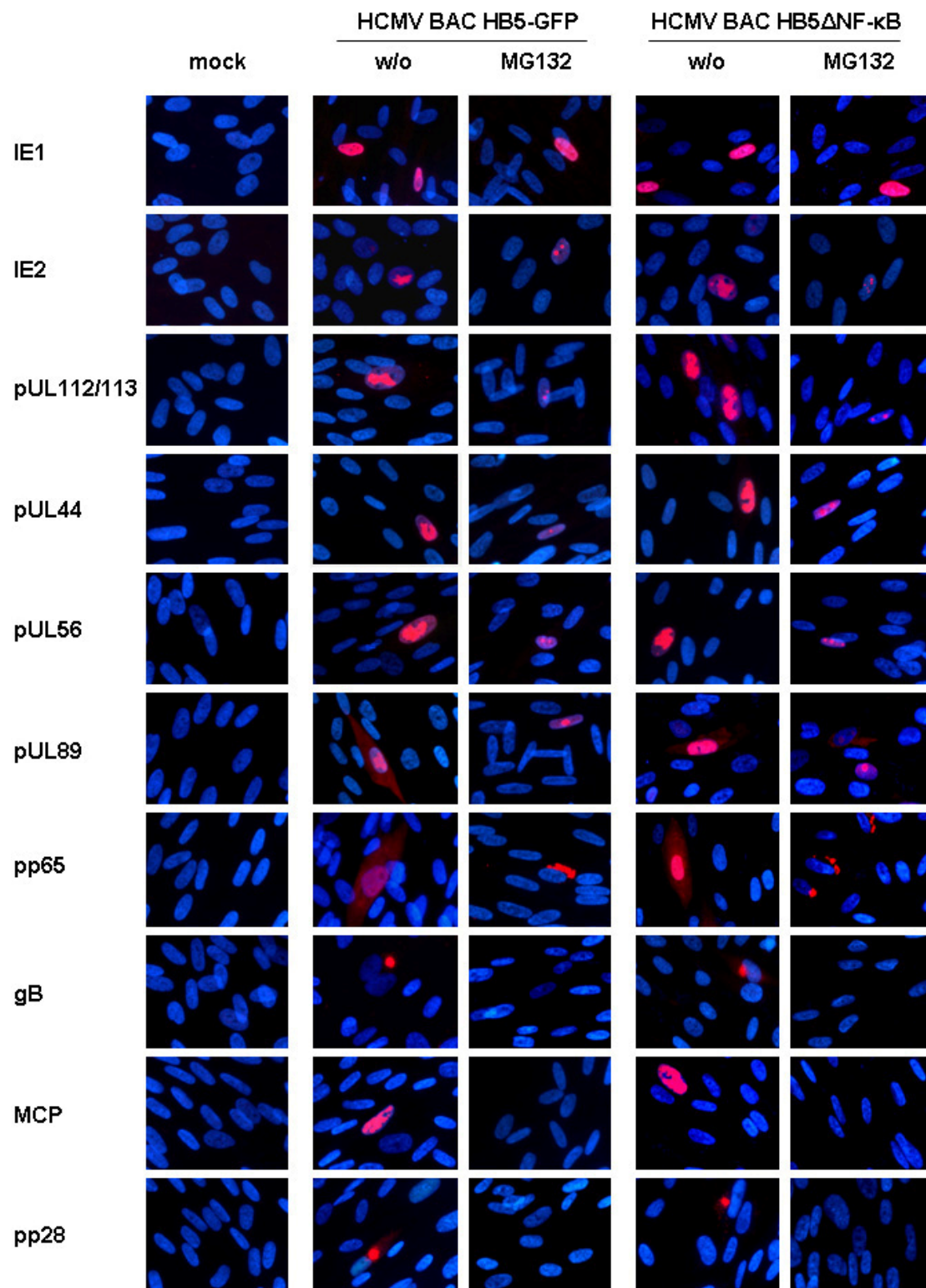


Abb. 36: Einfluss von MG132 auf die Proteinexpression der HCMV BACs HB5-GFP und HB5 Δ NF- κ B. Deckglaskulturen nichtinfizierter (mock) oder mit dem HCMV BAC HB5-GFP bzw. der Mutante HB5 Δ NF- κ B infizierter HELF (MOI 0.1) wurden mit 0.5 μ M MG132 oder dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) inkubiert. Die Zellen wurden 72 h p.i. fixiert. Anschließend erfolgte die indirekte Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Antikörpern gegen die viralen Proteine IE1, IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56, pUL89, pp65, gB, MCP und pp28. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen von drei unabhängigen Versuchen.

Anhand von drei unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die MG132-vermittelte Hemmung der Proteinexpression der BAC-Mutante HB5 Δ NF- κ B dem gleichen Muster wie die des BAC HB5-GFP folgte (siehe Abb. 36). Die Expression aller untersuchten sehr frühen und frühen Proteine war deutlich reduziert, zudem waren IE2, pUL112/113, pUL44, pUL56 und pUL89 in MG132-behandelten Zellen in Prä-Replikationszentren lokalisiert, während sie in den Kontrollzellen in Replikationszentren detektiert wurden. Das Tegumentprotein pp65 akkumulierte unabhängig davon, welches der beiden rekombinanten HCMV-Genome zur Infektion eingesetzt wurde, in Anwesenheit von MG132 in perinukleären Aggregaten. Die Aufnahmen dokumentieren weiterhin, dass die Expression der späten Proteine gB, MCP und pp28 sowohl bei HB5-GFP als auch bei HB5 Δ NF- κ B vollständig durch MG132 unterdrückt wurde.

Zusammenfassend konnte durch die Charakterisierung der Mutante gezeigt werden, dass die Hemmung der Aktivierung von NF- κ B nicht die Ursache für den antiviralen Effekt von PI ist. Die Inhibition der HCMV-Replikation scheint vielmehr über einen anderen, noch unbekannten Mechanismus abzulaufen.

3.3.2 Rolle der ND10 Komponenten PML und hDaxx

In HCMV-infizierten Zellen ist eine Reihe von viralen Proteinen wie beispielsweise IE1/2 sowie das Tegumentprotein pp71 mit *nuclear domain 10* (ND10) Strukturen assoziiert. Bei ND10, die in der Literatur auch als *PML oncogenic domains* (PODs) oder *PML bodies* zu finden sind, handelt es sich um distinkte subnukleäre Strukturen, die sich aus einer Vielzahl von Proteinen zusammensetzen. Die Hauptstrukturkomponente bildet dabei das *promyelotic leukemia protein* (PML); weitere wichtige Bestandteile sind beispielsweise hDaxx und Sp100. Nach bisherigem Verständnis sind ND10 in so verschiedene Prozesse wie Transkriptionsregulation, Apoptose und Interferon-vermittelte Abwehr viraler Infektionen involviert [LaMorte, 1998; Stadler, 1995; Wang, 1998b]. Für HCMV konnte bereits ein reprimierender Einfluss von PML und hDaxx auf die Transkription der viralen Gene nachgewiesen werden [Tavalai, 2006]. Darüber hinaus konnten Saffert *et al.* kürzlich zeigen, dass die pp71-vermittelte Neutralisation von hDaxx nötig ist,

um die IE-Transkription zu initiieren [Saffert, 2006]. Dabei induzierte pp71 den proteasomalen Abbau von hDaxx. Wurde hDaxx durch PI stabilisiert, so konnte dadurch die Expression von IE1 bei niedriger, nicht jedoch bei hoher MOI unterdrückt werden. Aufgrund der in den Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen beobachteten MOI-Abhängigkeit des Einflusses von PI auf die IE-Proteinexpression (siehe Abschnitt 3.2.7) wurde somit die Hypothese aufgestellt, dass die ND10 Komponenten hDaxx und/oder PML in den anti-HCMV-Effekt von PI involviert sind.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte die Initiation der HCMV-Replikation in PML- oder hDaxx-*knockdown* HFF untersucht werden. Es handelt sich dabei um HFF, die mit Retroviren transduziert wurden, um stabil siRNA gegen PML (siPML2) bzw. hDaxx (siDaxx1) zu exprimieren [Tavalai, 2006]. Als Kontrolle dienten HFF, welche infolge der retroviralen Transduktion nicht-funktionelle siRNA (siC) oder keine siRNA (Vektor) exprimieren [Tavalai, 2006]. Der stabile *knockdown* (kd) von PML bzw. hDaxx in diesen Zellen war zuvor von Tavalai *et al.* gezeigt worden [Tavalai, 2006]. Gesetzt den Fall, dass der anti-HCMV-Effekt von PI auf einer Stabilisierung von hDaxx oder PML beruht, so sollte die Replikation in den *knockdown*-Zellen nicht durch PI hemmbar sein.

Deckglaskulturen von PML- oder hDaxx-kd HFF bzw. Kontroll-HFF (Vektor, siC) wurden für 30 min mit 0.5 µM MG132 oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels vorinkubiert und anschließend mit dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 0.003 infiziert. Nach Fixierung der Zellen 24 h p.i. wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.2.2.4) mit einem Primärantikörper gegen IE1 und anti-Maus Cy2-konjugierten F(ab')₂ Fragmenten als Sekundärantikörper durchgeführt. Die Quantifizierung der IE1-positiven Zellen pro Deckgläschen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die Anzahl der IE1-positiven Zellen pro Deckgläschen der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle wurde jeweils 100% gesetzt.

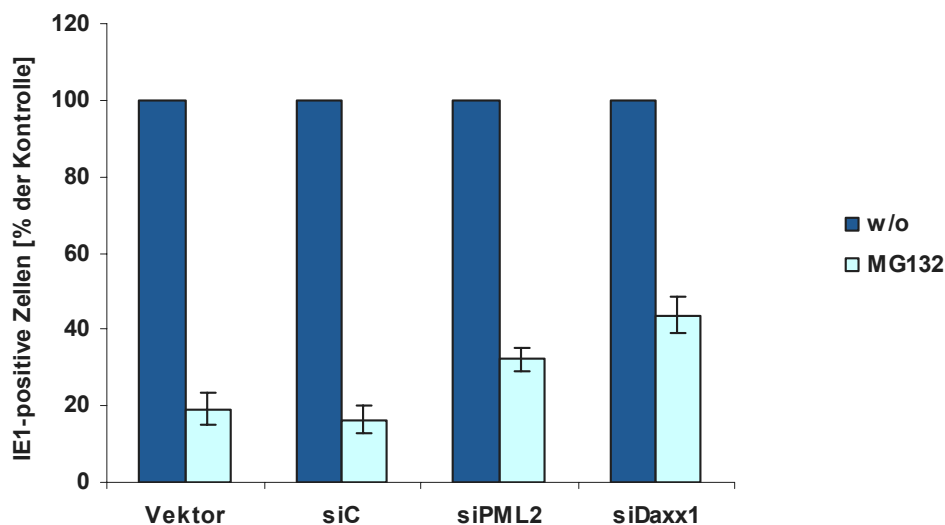


Abb. 37: Sensitivität der IE1-Expression gegenüber MG132 in PML- bzw. hDaxx-kd HFF. PML-kd HFF (siPML2), hDaxx-kd HFF (siDaxx1) und Kontroll-HFF (Vektor, siC) wurden mit 0.5 μ M MG132 bzw. dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (w/o) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit HCMV AD169 infiziert (MOI 0.003). Die Zellen wurden 24 h p.i. für eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen HCMV IE1 (mAb p63-27) fixiert. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) bezogen auf die jeweilige Lösungsmittel-behandelte Kontrolle aus einem Experiment mit drei unabhängigen Parallelansätzen.

Die Expression von IE1 konnte in PML-kd und hDaxx-kd HFF durch MG132 um 68% bzw. 56% im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle reduziert werden (siehe Abb. 37). Interessanterweise war die Anzahl der IE1-positiven Zellen in den behandelten PML-kd bzw. hDaxx-kd HFF damit jedoch höher als in den behandelten Kontrollzellen (Vektor, siC), bei welchen die IE1-Expression um 81% bzw. 84% gehemmt wurde. Obwohl der *knockdown* von PML bzw. hDaxx den anti-HCMV-Effekt von PI nicht neutralisierte, schien er zumindest eine partielle „Resistenz“ gegenüber MG132 zu verleihen.

Um auszuschließen, dass die IE1-Expression in den *knockdown*-Zellen aufgrund der Zytotoxizität von MG132 gehemmt war, wurde die CC_{50} mittels XTT Assay (siehe Abschnitt 2.2.1.8) bestimmt. Die CC_{50} für MG132 betrug $5.10 \pm 0.66 \mu$ M in „Vektor“-HFF, $4.35 \pm 0.72 \mu$ M in „siC“-HFF, $3.30 \pm 1.43 \mu$ M in PML-kd HFF sowie $4.05 \pm 1.47 \mu$ M in hDaxx-kd HFF und lag damit ca. 6-10fach über der Arbeitskonzentration. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Hemmung der IE1-Expression in *knockdown*-HFF nicht durch zytotoxische Nebeneffekte von MG132 bedingt wurde.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass PML und hDaxx in den antiviralen Effekt von PI involviert sind. Bedauerlicherweise standen keine HFF mit einem *knockdown* für beide Proteine zur Verfügung, so dass nicht überprüft werden konnte, ob sich die „Resistenz“ gegen MG132 durch einen kombinierten *knockdown* weiter steigern lässt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass HCMV nur die Umverteilung, nicht aber den proteasomalen Abbau von PML induziert [Xu, 2001], muss jedoch die Existenz weiterer zellulärer oder viraler Zielproteine von PI als wahrscheinlich angenommen werden.

4 Diskussion

Das Proteasom wurde lange Zeit als „Müllsammler“ oder „Hausmeister der Zelle“ angesehen [Wu, 2002], dessen Funktion lediglich im Abbau fehlgefalteter oder beschädigter Proteine besteht. Erst später wurde erkannt, dass das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) durch die selektive Degradation regulatorischer Proteine in fundamentale zelluläre Prozesse wie beispielsweise Zellzyklusregulation, Apoptose, DNA-Reparatur und Differenzierung sowie inflammatorische Prozesse und Antigenpräsentation involviert ist [Rivett, 2004; Varshavsky, 1997; Wang, 1998a; Wu, 2002].

Viren sind im Rahmen ihrer Replikation essentiell auf den Metabolismus der Wirtszelle angewiesen und haben daher eine Vielzahl von Strategien entwickelt, zelluläre Systeme oder Signalwege zu beeinflussen, um ihre eigene Vermehrung zu begünstigen und voranzutreiben. Auch das UPS scheint ein bevorzugtes Ziel viraler Manipulationen zu sein. So konnte anhand von Studien mit Proteasominhibitoren (PI) gezeigt werden, dass Proteasom-abhängige Prozesse im Replikationszyklus einer Reihe von Viren wie beispielsweise HIV, HSV, Influenza, Cocksackievirus B3 oder VSV vorhanden sind [Khor, 2003; Luo, 2003; Neznanov, 2008; Schubert, 2000].

Auch für HCMV wurde kürzlich eine inhibitorische Wirkung von PI auf die Virusreplikation beschrieben [Prösch, 2003]. Auf der Grundlage dieser Beobachtung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter spezifiziert, welche Rolle das Proteasom bei der HCMV-Replikation spielt. Zum einen wurde untersucht, ob HCMV die Aktivität und/oder die Zusammensetzung des Proteasoms beeinflusst. Zum anderen wurde detailliert charakterisiert, welche Auswirkungen die Hemmung der Proteasomaktivität auf die Virusreplikation hat. Darüber hinaus wurde der Wirkungsmechanismus des anti-HCMV-Effekts von PI näher untersucht.

4.1 Einfluss von HCMV auf die Proteasomaktivität

Da bereits bekannt war, dass Funktionalität und Aktivität des Proteasoms essentiell für die HCMV-Replikation sind [Prösch, 2003], wurde zunächst untersucht, ob das Virus möglicherweise Einfluss auf die katalytische Aktivität des Proteasoms nimmt. Die Experimente beschränkten sich dabei auf die Untersuchung der Chymotrypsin-ähnlichen (CT-L) Aktivität, da die Trypsin-ähnliche (T-L) und die Peptidylglutamyl-Peptid-hydrolysierende (PGPH) Aktivität nicht in Zelllysaten gemessen werden können. Die CT-L Aktivität leistet jedoch den Hauptanteil des proteasomalen Proteinabbaus [Arendt, 1997; Kisselev, 1999], so dass die Experimente trotz dieser Beschränkung ein genaues Bild von der Beeinflussung der proteasomalen Proteindegradation zeichnen.

Die Versuche ergaben, dass die CT-L Aktivität in Abhängigkeit von der MOI in HCMV-infizierten HELF bis zu siebenfach im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle erhöht war (siehe Abb. 9). Die Abhängigkeit der Replikation vom UPS geht bei Viren jedoch nicht immer zwangsläufig mit einer Erhöhung der Proteasomaktivität einher. So konnte bei Coxsackievirus B3 selbst bei einer MOI von 100 keine Erhöhung der CT-L Aktivität in murinen Kardiomyozyten festgestellt werden [Luo, 2003]. Die für HCMV beobachtete Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität könnte einerseits „aktiv“ vom Virus induziert werden. Andererseits wäre es möglich, dass die Erhöhung der CT-L Aktivität lediglich eine Folge der „passiven“ Induktion des Immunproteasoms ist, welches über eine gesteigerte CT-L Aktivität im Vergleich zum konstitutiven Proteasom verfügt. Bereits die Bindung des Virus an die Wirtszelle könnte dabei die Induktion des Immunproteasoms auslösen. Bei der Adsorption wird HCMV durch den *Toll-like receptor 2* erkannt. Die dadurch ausgelöste Signaltransduktionskaskade führt zur Ausschüttung von Interferon- α und - β [Botero, 2008; Juckem, 2008], welche wie Interferon- γ den Wechsel vom konstitutiven Proteasom zum Immunproteasom induzieren können [Shin, 2006]. Dabei werden die konstitutiven Untereinheiten $\beta 1/\delta$, $\beta 2/Z$ und $\beta 5/MB1$ durch die homologen Immunproteasomuntereinheiten $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL1$ und $\beta 5i/LMP7$ ersetzt [Eleuteri, 1997; Shin, 2006; Toes, 2001; Ustrell, 1995]. Zudem wird das Immunproteasom präferentiell von regulatorischen 11S

Untereinheiten (auch als *proteasome activator 28* bezeichnet) flankiert, während das konstitutive Proteasom üblicherweise mit 19S Untereinheiten assoziiert ist [Groettrup, 1996].

Um zu untersuchen, ob die Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF auf der Induktion des Immunproteasoms beruht, wurden Versuche mit UV-inaktiviertem Virus durchgeführt. Durch die UV-Behandlung wird das Virusgenom irreparabel geschädigt, so dass es nicht mehr zur Expression viraler Proteine kommt. Adsorption und Viruseintritt werden durch die UV-Inaktivierung nicht beeinträchtigt. In HELF, die mit UV-inaktiviertem Virus infiziert wurden, war die CT-L Proteasomaktivität lediglich um ca. 30% im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle erhöht (siehe Abb. 10). Adsorption und Eintritt von HCMV in die Wirtszelle waren somit nicht hinreichend, um eine signifikante Steigerung der CT-L Proteasomaktivität zu erreichen. Demzufolge scheint die Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF nicht auf der Induktion des Immunproteasoms zu beruhen. Um dies jedoch sicher ausschließen zu können, wurde die Zusammensetzung des Proteasoms in nichtinfizierten und HCMV-infizierten HELF 24, 48 und 72 h p.i. mit Hilfe von Western Blot-Analysen charakterisiert. Die Immunproteasomuntereinheiten $\beta 5i$ /LMP7 und $\beta 1i$ /LMP2 wurden zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in HCMV-infizierten HELF detektiert (siehe Abb. 11). In Übereinstimmung damit war die Expression der konstitutiven Proteasomuntereinheiten $\beta 5$ /MB1 und $\beta 1$ /delta in HCMV-infizierten HELF unverändert im Vergleich zu den nichtinfizierten Kontrollzellen. Weiterhin konnte in vorläufigen Experimenten kein Unterschied zwischen nichtinfizierten und HCMV-infizierten HELF bezüglich der Expression der regulatorischen 11S Untereinheit festgestellt werden (zugehörige Daten nicht gezeigt). Der Austausch der konstitutiven Untereinheit $\beta 2/Z$ gegen die Immunproteasomuntereinheit $\beta 2i$ /MECL1 konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da alle für humanes $\beta 2i$ /MECL1 kommerziell erhältlichen Antikörper mit der konstitutiven Untereinheit $\beta 2/Z$ kreuzreagieren (D. Siele, Institut für Biochemie der Charité zu Berlin; persönliche Kommunikation). Aufgrund der Beobachtung, dass der Einbau von $\beta 2i$ /MECL1 in das Immunproteasom nur in Anwesenheit von $\beta 1i$ /LMP2 stattfindet [Groettrup, 1997], sollte die

Betrachtung der Untereinheiten $\beta 5i$ /LMP7 und $\beta 1i$ /LMP2 jedoch hinreichend sein, um eine Aussage über die Zusammensetzung des Proteasoms in HCMV-infizierten HELF treffen zu können.

Die Western Blot-Analysen ergaben zusammenfassend, dass HCMV die Induktion des Immunproteasoms in HELF über den Zeitraum des gesamten Replikationszyklus unterdrückt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von Khan *et al.*, die mittels zweidimensionaler SDS-PAGE zeigen konnten, dass die Induktion des Immunproteasoms sowohl in HCMV-infizierten als auch in MCMV-infizierten Fibroblasten 72 h p.i. (HCMV) bzw. 30 h p.i. (MCMV) supprimiert ist [Khan, 2003]. Bei MCMV wird dies vermutlich durch M27, einen Inhibitor des Interferon- γ Signalwegs, erreicht [Zimmermann, 2005]. Ob HCMV die Expression der Immunproteasom-untereinheiten durch einen ähnlichen Mechanismus unterdrückt, ist bislang nicht bekannt.

Aus den Experimenten mit UV-inaktiviertem Virus war bekannt, dass die Expression viraler Proteine nötig ist, um eine Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität in HCMV-infizierten HELF auszulösen (siehe oben). Um einen ersten Hinweis darauf zu erhalten, welche virale Proteinklasse für die Induktion verantwortlich ist, wurde eine Kinetik der CT-L Proteasomaktivität für verschiedene MOIs (MOI 0.05, 0.1, 0.5, 1 und 2) über den gesamten HCMV-Replikationszyklus erstellt. Bereits 24 h nach Infektion war die CT-L Aktivität bei allen untersuchten MOIs im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle deutlich erhöht und stieg dann bis 72 h p.i. stetig an (siehe Abb. 12). Diese Versuche deuteten darauf hin, dass die Erhöhung der CT-L Aktivität bereits in der sehr frühen oder frühen Phase des Replikationszyklus induziert wird. Um andererseits die Auswirkung der Hemmung einzelner viraler Proteinklassen auf die CT-L Proteasomaktivität abschätzen zu können, wurde eine Studie mit Cycloheximid, einem Inhibitor der eukaryotischen Translation, durchgeführt. Diese Versuche ergaben, dass die Erhöhung der Proteasomaktivität am effektivsten neutralisiert wird, wenn die Zugabe des Inhibitors bis zu 24 h p.i. erfolgt (siehe Abb. 13). In Übereinstimmung mit der oben diskutierten Kinetik impliziert die Cycloheximid-Studie, dass sehr frühe oder frühe virale Proteine für die Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität verantwortlich sind.

Hinsichtlich des Mechanismus der HCMV-vermittelten Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität sind folgende Szenarien denkbar. Zum einen könnte HCMV die *de novo* Synthese proteasomaler Untereinheiten induzieren. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde in DNA-Array-Analysen HCMV-infizierter Fibroblasten 24 h p.i. eine Zunahme der mRNA-Level einiger Proteasomuntereinheiten beobachtet [Zhu, 1998]. So waren die mRNA-Level der Untereinheiten alpha 1, alpha 2 und alpha 7 jeweils um den Faktor 4-6 im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen gesteigert. Die mRNA-Menge der ATPase-Untereinheit S4 des regulatorischen 19S Komplexes war 16fach erhöht. In den hier durchgeführten Western Blot-Studien konnte jedoch über den gesamten Zeitraum des viralen Replikationszyklus keine Veränderung der Expression der Untereinheiten $\beta 5/\text{MB1}$, alpha 4 oder $\beta 1/\text{delta}$ beobachtet werden (siehe Abb. 11). Da vor allem die katalytischen Untereinheiten $\beta 5/\text{MB1}$ und $\beta 1/\text{delta}$ essentiell für die *de novo* Synthese von konstitutiven Proteasomen sind, ist die Zunahme des Proteasomgehalts der Wirtszelle als Mechanismus für die Erhöhung der Proteasomaktivität somit eher unwahrscheinlich. Es wäre jedoch denkbar, dass in der Zelle vorhandene latente 20S Proteasomen durch HCMV aktiviert werden [Liu, 2003]. Bei latenten 20S Proteasomen ist die Eintrittspforte für Substrate, der so genannte α -Annulus durch die N-Termini bestimmter α -Untereinheiten verschlossen. Durch Anlagerung von regulatorischen Untereinheiten wie beispielsweise des 19S Komplexes wird der α -Annulus geöffnet, so dass die katalytischen Zentren zugänglich werden und die Proteasomaktivität ansteigt [Whitby, 2000]. Des Weiteren könnte die Proteasomaktivität über post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierungen [Bose, 1999; Mason, 1996] oder Glykosylierungen [Zhang, 2003] reguliert werden.

Über die Beeinflussung der Aktivität des konstitutiven Proteasoms durch Viren ist bislang nur sehr wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Tax-Protein des *Human T-Cell Leukemia Virus Type-1* (HTLV-1) direkt an nukleäre Proteasomen bindet und dass aufgereinigte konstitutive Proteasomen aus Tax-transfizierten 293T Zellen eine erhöhte CT-L und T-L Aktivität aufweisen [Hemelaar, 2001]. Ob HCMV die CT-L Proteasomaktivität durch einen ähnlichen Mechanismus erhöht, wurde im Rahmen der

vorliegenden Arbeit nicht untersucht und soll Gegenstand weiterführender Experimente sein.

Zusammenfassend scheint das Verhältnis von HCMV zum Proteasom ambivalent zu sein. Auf der einen Seite unterdrückt HCMV die Bildung des Immunproteasoms in infizierten Zellen, da das Immunproteasom bevorzugt Peptide zytoplasmatischer Proteine für die Antigenpräsentation über MHC Klasse-I Moleküle generiert [Chen, 2001; Rock, 1999]. Es handelt sich somit um einen Mechanismus, mit dessen Hilfe sich das Virus dem Zugriff des Immunsystems entzieht. Auf der anderen Seite scheint die Erhöhung der Aktivität des konstitutiven Proteasoms von Vorteil für die HCMV-Replikation zu sein. Eine erhöhte Proteasomaktivität könnte sich aus folgenden Gründen günstig auf die Virusreplikation auswirken: Das Proteasom bewerkstelligt 75-95% des gesamten Proteinabbaus der Zelle [Craiu, 1997]. Die gesteigerte Proteasomaktivität führt somit zu einer höheren Degradations- und Durchsatzrate von Proteinen. Dadurch werden vermehrt Aminosäuren zur Neusynthese von Proteinen zur Verfügung gestellt. Eine erhöhte Proteasomaktivität könnte somit den großen Bedarf an Aminosäuren für die virale Proteinsynthese decken. Weiterhin wäre denkbar, dass durch die erhöhte Aktivität des konstitutiven Proteasoms verstärkt zelluläre Proteine abgebaut werden, die andernfalls mit der Virusreplikation interferieren. Nicht zuletzt ist das Proteasom in die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren oder anderen regulatorischen Proteinen involviert, welche das zelluläre Milieu in einer für HCMV vorteilhaften Weise beeinflussen könnten.

4.2 Charakterisierung des anti-HCMV-Effekts von PI

Für HCMV wurde kürzlich gezeigt, dass die Inhibition der Proteasomaktivität durch MG132 die Hemmung der Virusreplikation zur Folge hat [Prösch, 2003]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zunächst die Hemmung der HCMV-Replikation durch MG132 verifiziert werden (siehe Abb. 15). Darüber hinaus konnte die Virusreplikation auch durch andere PI wie beispielsweise BSc2118, MG262 und Lactacystin unterdrückt werden (siehe Abb. 15). Die Replikation des α -Herpesvirus HSV-1 kann ebenfalls durch eine Reihe von PI

gehemmt werden [La Frazia, 2006]. Für das γ -Herpesvirus EBV wurden zwar vielfältige Interaktionen mit dem UPS zur Regulation der Latenz und zur Deregulation zellulärer Onkogene beschrieben [Dantuma, 2003; Masucci, 2001]; es gibt jedoch keine Studien zum Einfluss von PI auf die EBV-Replikation. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob weitere Mitglieder der Herpesviridae wie beispielsweise VZV oder HHV-6 Proteasom-abhängige Prozesse in ihren Replikationszyklen aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Effekt von MG132 auf die Replikation des α -Herpesvirus VZV untersucht werden. Die Versuche zeigten jedoch, dass die VZV-Replikation im Gegensatz zu HSV-1 und HCMV nicht durch MG132 inhibiert werden kann (siehe Abb. 17). Die unterschiedliche Sensitivität der einzelnen Mitglieder der Herpesviridae gegenüber PI deutet darauf hin, dass es keine für die gesamte Virusfamilie einheitliche Interaktion mit dem UPS gibt, sondern sich vielmehr spezifische Proteasom-abhängige Prozesse in der Replikation der einzelnen Herpesviren herausgebildet haben.

Da eine Vielzahl von PI (insbesondere aus der Klasse der Peptidaldehyde) neben dem Proteasom auch nicht-proteasomale zelluläre Proteasen wie beispielsweise Calpaine und Cathepsine hemmt [Mellgren, 1997; Tsubuki, 1996], sollte im Folgenden getestet werden, ob die HCMV-Replikation auch durch die Hemmung dieser Proteasen unterdrückt werden kann. Die Versuche zeigten jedoch, dass die Calpaininhibitoren I und II keinen Einfluss auf die HCMV-Replikation hatten (siehe Abb. 18). Somit konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Aktivität des Proteasoms essentiell für die HCMV-Replikation ist und der anti-HCMV-Effekt von PI unabhängig von der Hemmung nicht-proteasomaler zellulärer Proteasen ist. Im Einklang mit diesem Ergebnis steht auch, dass die HCMV-Replikation durch den hochspezifischen Inhibitor Lactacystin, für den bislang keine Wechselwirkung mit nicht-proteasomalen Proteasen beschrieben wurde, gehemmt werden konnte.

Mit dem Ziel, den anti-HCMV-Effekt von PI näher zu charakterisieren, wurde zunächst mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Analysen untersucht, ob in PI-behandelten Zellen überhaupt virale Kapside oder infektiöse Viruspartikel gebildet werden. Interessanterweise wurde die Bildung infektiöser Nachkommenviren durch PI jedoch nicht nur reduziert, sondern vollständig

unterdrückt. In allen analysierten Ultradünnschnitten wurden weder reife Virionen noch Kapside, Pro-Kapside oder nicht-infektiöse Partikel detektiert (siehe Abb. 20). Folglich ist anzunehmen, dass ein zeitlich vor der Virusreifung gelegener, essentieller Schritt des viralen Replikationszyklus durch PI blockiert wird. Im Folgenden wurde daher der Frage nachgegangen, welche Prozesse der HCMV-Replikation, die eine Voraussetzung für die Bildung infektiöser Nachkommenviren darstellen, möglicherweise durch PI gehemmt werden.

Für Influenza wurde bereits beschrieben, dass MG132 und Lactacystin den Eintritt des Virus in die Wirtszelle inhibieren, indem sie mit der endozytotischen Aufnahme und der Sortierung des Virus in späte Endosomen interferieren [Khor, 2003]. Anders als Influenza dringt HCMV durch direkte Fusion der Virushülle mit der Zellmembran in die Wirtszelle ein. Zumindest für den Eintritt von HCMV in Endothelzellen wird jedoch eine Beteiligung endozytotischer Vorgänge diskutiert [Ryckman, 2006; Sinzger, 2008]. Um daher sicher ausschließen zu können, dass PI bereits diesen ersten Schritt des viralen Replikationszyklus beeinflussen, wurde der Eintritt von HCMV in HELF nach Vorinkubation mit MG132 untersucht. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl der HCMV-positiven Zellen zwischen den Kontrollzellen und den PI-behandelten Zellen festgestellt werden (siehe Abb. 21 B). Somit wird der Eintritt von HCMV in die Wirtszelle nicht durch MG132 beeinträchtigt. Demnach müssen andere Prozesse der Virusreplikation durch PI gehemmt werden, die später im Replikationszyklus stattfinden.

Um herauszufinden, in welcher Phase des viralen Replikationszyklus die Zugabe von PI den stärksten Effekt auf die Virusreplikation ausübt, wurde eine „*time of addition*“-Analyse mit MG132 durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.6). Wurde MG132 bis zu 48 h p.i. zugegeben, so ergab sich eine Hemmung der Virusreplikation um durchschnittlich 90% (siehe Abb. 23). Selbst wenn die Zugabe von MG132 erst nach Vollendung des ersten Replikationszyklus (72 h p.i.) erfolgte, konnte die weitere Vermehrung von HCMV noch um 54% reduziert werden. Folglich konnte die Virusreplikation bis zum späten Stadium des Replikationszyklus durch MG132 gehemmt werden. Die Sensitivität gegenüber dem Proteasominhibitor war jedoch in der sehr frühen und frühen Phase am stärksten ausgeprägt. Dieses Ergebnis

deutete darauf hin, dass das Proteasom in verschiedene Prozesse im viralen Replikationszyklus involviert ist.

Mit dem Ziel, nähere Informationen darüber zu erhalten, um welche Prozesse es sich dabei handelt, wurde zunächst der Einfluss von PI auf die virale Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen näher charakterisiert. Eine erste Untersuchung der HCMV-Proteinexpression in PI-behandelten HELF war bereits von Prösch *et al.* durchgeführt worden [Prösch, 2003]. Die Ergebnisse dieser Studie legten die Vermutung nahe, dass vor allem die Expression des sehr frühen Proteins IE2 unterdrückt ist, während das Expressionslevel von IE1 unverändert bleibt. Zudem wurde gezeigt, dass die Expression des frühen Proteins pUL44 und des *early late*-Proteins pp65 in Anwesenheit von MG132 deutlich reduziert ist. Es wurde somit von Prösch *et al.* postuliert, dass die Reduktion der Expression früher und später viraler Proteine auf der Hemmung der IE2-Expression beruht [Prösch, 2003].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten konnten die Ergebnisse von Prösch *et al.* jedoch nur teilweise bestätigen. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass der Effekt von PI auf die Expression der IE-Proteine von der MOI abhängt (siehe Abschnitt 3.2.7.2). Bei niedriger MOI (MOI 0.1) waren sowohl die Expression von IE1 als auch die Expression von IE2 stark gehemmt (siehe Abb. 25 A). Bei hoher MOI (MOI ≥ 1) lagen gleiche IE1/2-Proteinlevel in MG132-behandelten Zellen und Kontrollzellen vor. Dabei fiel auf, dass die Expression von IE1 im Vergleich zu IE2 weniger sensitiv gegenüber MG132 war. Da die mRNAs für IE1 und IE2 aus einem gemeinsamen Primärtranskript hervorgehen, muss folglich angenommen werden, dass im Fall von IE2 posttranskriptionale Prozesse wie beispielsweise das Spleißen stärker durch PI beeinflusst werden.

In der Studie von Prösch *et al.* war ferner postuliert worden, dass die Expression der IE-Proteine nicht nur reduziert, sondern auch zeitlich verschoben ist [Prösch, 2003]. Diese Hypothese konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Bei der Analyse der viralen Proteinexpression 120 h p.i. zeigte sich das gleiche Repressionsmuster von MG132 wie 72 h p.i. (siehe Abb. 27). Es kann somit geschlussfolgert werden,

dass MG132 die virale Proteinexpression nicht verzögert, sondern dauerhaft reprimiert.

IE1 und IE2 sind die zentralen viralen Transaktivatoren und üben eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen aus. So beeinflussen sie die Expression zahlreicher zellulärer Proteine wie beispielsweise Regulatoren des Zellzyklus oder Proteine des Nukleinsäurestoffwechsels [Kalejta, 2002; Wade, 1992; Wiebusch, 2001]. Darüber hinaus induzieren sie die Expression der frühen und späten viralen Proteine und kontrollieren ihre eigene Expression. So erfolgt eine positive Autoregulation der IE-Expression durch IE1 in Kooperation mit NF- κ B in der frühen Phase des Replikationszyklus [Cherrington, 1989]. In der späten Phase der Replikation wird die IE-Expression durch Bindung von IE2_{579AS} zusammen mit der Spleißvariante IE2_{338AS} an das *cis-repression signal* im MIE-Enhancer/Promotor unterdrückt [Cherrington, 1991]. Trotz der zentralen Rolle von IE1 für die Virusreplikation sind IE1-Deletionsmutanten nur bei niedriger MOI (MOI 0.1) replikationsdefizient und zeigen bei MOI > 3 ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum [Gawn, 2002; Greaves, 1998; Mocarski, 1996]. Als Erklärung für diese MOI-Abhängigkeit wird eine Kompensation der IE1-vermittelten autoregulatorischen Stimulation des MIEP durch Tegumentproteine wie beispielsweise pp71 bei hoher MOI diskutiert [Mocarski, 1996]. Im Gegensatz dazu sind IE2-Deletionsmutanten durch die fehlende Induktion der frühen Proteinexpression MOI-unabhängig replikationsdefizient [Heider, 2002; Marchini, 2001].

In Übereinstimmung damit zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen ebenfalls eine starke Hemmung der Expression früher Proteine durch PI (siehe Abschnitt 3.2.7). So waren die Expressionslevel von pUL44 MOI-unabhängig reduziert (siehe Abb. 25). Zudem war die intranukleäre Verteilung der frühen Proteine pUL112/113, pUL44, pUL56 und pUL89 in PI-behandelten HELF unabhängig von der MOI verändert. Während diese Proteine in den Kontrollzellen in großen, nierenförmigen Replikationszentren lokalisiert waren [Ahn, 1999; Giesen, 2000], zeigten sie in PI-behandelten Zellen eine Lokalisation in kleinen, punktförmigen Prä-Replikationszentren (siehe Abb. 24). Interessanterweise zeigte auch IE2 bei einer MOI von 1 in PI-behandelten

Zellen eine Lokalisation in Prä-Replikationszentren, obwohl die IE2-Proteinmenge bei dieser MOI den Western Blot-Analysen zufolge nicht reduziert war. Dieses zunächst widersprüchlich erscheinende Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass in PI-behandelten Zellen Prä-Replikationszentren existieren, die zwar IE2, jedoch keine frühen Proteine wie beispielsweise pUL112/113 oder pUL44 enthalten. Ob dies tatsächlich der Fall ist, müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Die beobachtete PI-vermittelte Hemmung der Expression früher viraler Proteine kann nicht allein durch die verminderten IE1/2-Proteinlevel erklärt werden. Bei einer MOI von 1 lagen IE1 und IE2 trotz PI-Behandlung in ausreichender Menge vor, um die Expression der nachfolgenden Proteinklassen zu induzieren. Dennoch war die Expression der frühen Proteine reduziert. Folglich muss angenommen werden, dass weitere Proteasom-abhängige Prozesse im Replikationszyklus von HCMV existieren. Darüber hinaus wurde die Expansion von Prä-Replikationszentren zu Replikationszentren MOI-unabhängig durch PI gehemmt. Andere Inhibitoren der herpesviralen DNA-Replikation wie beispielsweise Ganciclovir und Foscarnet interferieren ebenfalls mit der Bildung von Replikationszentren [Lukonis, 1996; Penfold, 1997]. Dabei unterscheidet sich das Erscheinungsbild der Prä-Replikationszentren jedoch deutlich von dem hier beobachteten Phänotyp. Während in Ganciclovir-behandelten Zellen eine Vielzahl von Prä-Replikationszentren (> 20 pro Zelle) detektiert werden kann, zeigen PI-behandelte Zellen durchschnittlich 2-3 Prä-Replikationszentren (siehe Abb. 24), die zudem auch etwas größer als in Ganciclovir-behandelten Zellen sind. Da es sich in beiden Fällen um Prä-Replikationszentren handelt, ist zu vermuten, dass die jeweiligen Inhibitoren auf verschiedene Weise mit der Reifung von Replikationszentren interferieren. Am Beispiel von HSV wurde bereits beschrieben, dass „reife“ Replikationszentren aus der Verschmelzung benachbarter Prä-Replikationszentren hervorgehen [Taylor, 2003]. Auf welche Weise PI mit der Bildung von „reifen“ Replikationszentren interferieren könnten, ist noch nicht bekannt und müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Die Hemmung der Expression des *early late*-Proteins pp65 durch PI war im Vergleich zu den frühen Proteinen schwächer ausgeprägt (siehe Abb. 25). Bei

niedriger MOI war die pp65-Expression stark reduziert. Mit steigender MOI nahm jedoch auch die Menge an pp65 zu. Es konnten zudem Unterschiede zwischen PI-behandelten Zellen und Kontrollzellen im Hinblick auf die Verteilung von pp65 festgestellt werden. Während pp65 in den Kontrollzellen überwiegend im Zytoplasma lokalisiert war, akkumulierte das Protein in PI-behandelten Zellen in perinukleären Aggregaten (siehe Abb. 24). Der Effekt von PI auf die Lokalisation von pp65 war unabhängig von der MOI. Die Transaktivierung des pp65-Promotors erfolgt durch IE1 zusammen mit IE2 [Depto, 1989]. Die MOI-abhängige Hemmung der Expression von pp65 ist somit vermutlich ein direkter Effekt der Verfügbarkeit von IE1/2.

Am stärksten wurde die Expression der späten HCMV-Proteine durch PI beeinflusst. So waren die Proteine gB, MCP und pp28 in Anwesenheit von MG132 nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 24 und 25). Die Expression der späten Proteine war sowohl bei niedriger als auch bei hoher MOI vollständig unterdrückt. Da es sich zumeist um Glykoproteine der Virushülle sowie Tegument- oder Kapsidproteine handelt, ist die Expression der späten Proteine essentiell für die Bildung infektiöser Nachkommenviren. Am Beispiel von pp28 konnte bereits gezeigt werden, dass eine pp28-Nullmutante nicht in der Lage ist, infektiöse Nachkommenviren zu produzieren [Silva, 2003]. Die Ursache dafür scheint eine Blockade der finalen Umhüllung der Virionen zu sein. Die in den elektronenmikroskopischen Analysen PI-behandelter Zellen beobachtete Abwesenheit infektiöser Nachkommenviren beruht somit auf der kompletten Hemmung der Expression später Proteine.

Bei der Reifung von HCMV wird die konkatemere virale DNA durch die Terminase in einzelne Genomeinheiten gespalten, welche anschließend über das Portalprotein pUL104 in die Kapside inseriert werden [Dittmer, 2005a; Dittmer, 2005b]. Die virale Terminase besteht aus den Untereinheiten pUL56 und pUL89. Während pUL56 die Bindung zwischen DNA und Pro-Kapsid vermittelt und die Energie für die Insertion der DNA in die Kapside bereitstellt, führt pUL89 die Spaltung der Konkatemere aus [Bogner, 1998; Scheffczik, 2002]. Aufgrund der in den Immunfluoreszenzanalysen beobachteten reduzierten Expression von pUL56 und pUL89 sollte mittels Pulsfeldgelelektrophorese untersucht werden, ob die Spaltung der konkatemeren viralen DNA in MG132-behandelten Zellen noch stattfindet. Die

Versuche ergaben, dass die Menge an monomerer HCMV-DNA mit steigender Konzentration von MG132 abnahm (siehe Abb. 28). Die Hemmung der DNA-Spaltung könnte einerseits auf einer direkten Beeinflussung der Aktivität der Terminase beruhen. Unter Berücksichtigung der in den Western Blot- und Immunfluoreszenzanalysen beobachteten Reduktion der Expression von pUL112/113 und pUL44 durch PI wäre andererseits denkbar, dass ein Mangel an konkatemerer viraler DNA als Substrat für die Terminase der Grund für die verminderte DNA-Spaltung ist. Daher sollte aufgeklärt werden, inwiefern die virale DNA-Replikation durch die reduzierten Proteinlevel von pUL112/113 und pUL44 beeinflusst wird.

Die frühen Proteine pUL112/113 und pUL44 sind essentielle Ko-Faktoren der viralen DNA-Replikation [Pari, 1993]. Aus der *UL112/113*-Region des viralen Genoms gehen durch alternatives Spleißen vier Proteine hervor, die über einen einheitlichen N-Terminus verfügen. Den einzelnen Spleißvarianten konnten noch keine individuellen Funktionen zugeordnet werden. Die pUL112/113-Proteine ko-lokalisieren mit viraler DNA an der Peripherie der nukleären ND10 Strukturen [Yamamoto, 1998]. Ihre Funktion scheint vor allem darin zu bestehen, weitere Faktoren der viralen DNA-Replikation wie beispielsweise pUL44 zu den Replikationszentren zu rekrutieren [Park, 2006]. pUL44 fungiert als akzessorisches Protein der viralen DNA-Polymerase pUL54. Es vermittelt die Bindung zwischen pUL54 und der viralen DNA und fördert die Synthese langkettiger DNA [Weiland, 1994]. Da sowohl pUL112/113 als auch pUL44 eine entscheidende Rolle bei der viralen DNA-Replikation spielen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die PI-vermittelte Reduktion der pUL112/113- und pUL44-Level die Neusynthese viraler DNA beeinträchtigt wird. In der Studie von Prösch *et al.* wurde bereits mittels quantitativer RT-PCR gezeigt, dass die Anzahl viraler Genome in Gegenwart von MG132 um zwei Größenordnungen im Vergleich zur Kontrolle reduziert war und über einen Zeitraum von fünf Tagen nur leicht anstieg [Prösch, 2003]. Um den Einfluss von PI auf die *de novo* Synthese viraler DNA näher zu charakterisieren, wurde die Inkorporation des Nukleosidanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU) in die virale DNA analysiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Prösch *et al.* konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die virale DNA-Replikation mit steigenden Konzen-

trationen von MG132 inhibiert wird (siehe Abb. 29). Die Hemmung der viralen DNA-Replikation könnte auch die beobachtete Blockade der *true late*-Proteinexpression erklären, da diese durch einen noch ungeklärten Mechanismus nur nach vollendeter DNA-Replikation exprimiert werden. Weiterhin erscheint es in Anbetracht dieser Ergebnisse als wahrscheinlich, dass die Hemmung der Spaltung der viralen DNA eher auf der geringen Menge viraler DNA als auf einer direkten Hemmung der katalytischen Aktivität von pUL89 beruht. Die Hypothese müsste jedoch in weiterführenden Experimenten geprüft werden.

Zusammenfassend zeigten die Studien mit PI eine effiziente Hemmung der HCMV-Replikation. Dabei erhärtete sich die Modellvorstellung, dass mehrere essentielle Proteasom-abhängige Prozesse im viralen Replikationszyklus existieren. So wird zum einen die Expression der sehr frühen Proteine IE1 und IE2 bei niedriger MOI gehemmt. Bei hoher MOI ist die Hemmung der IE-Expression aufgehoben. Dennoch ist die Expression der nachfolgenden frühen Proteine auch bei hoher MOI stark reduziert. Zudem wird die Expansion der Replikationszentren, in welchen die Replikation der viralen DNA, die Expression der späten Proteine sowie die Assemblierung der Kapside abläuft, durch PI unterdrückt. Auch die Neusynthese viraler DNA ist stark gehemmt. Ein Grund dafür könnten die reduzierten Level früher Proteine wie z.B. pUL112/113 und pUL44, die als Replikationsfaktoren fungieren, sowie die Abwesenheit „reifer“ Replikationszentren sein. Aus der Hemmung der viralen DNA-Replikation resultiert die Blockade der Expression später (*true late*) Proteine. Da es sich bei späten Proteinen zumeist um Strukturproteine handelt, wird der Prozess der Morphogenese gestört und es werden keine Kapside bzw. Virionen gebildet. Unklar ist noch, ob die Spaltung der konkatemeren viralen DNA direkt durch PI oder indirekt durch einen Mangel an Substrat beeinflusst wird.

4.3 Untersuchungen zum Mechanismus des anti-HCMV-Effekts von PI

Prinzipiell könnte der anti-HCMV-Effekt von PI zum einen auf die Inhibition der Expression eines essentiellen viralen Proteins zurückzuführen sein. Zum anderen wäre es möglich, dass die Virusreplikation durch die Hemmung der Expression oder Aktivierung eines essentiellen zellulären Proteins supprimiert wird. Schließlich wäre denkbar, dass der beobachtete Effekt auf der Stabilisierung eines antiviral wirkenden Faktors beruht.

Als potentielle Ursachen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie die Stabilisierung von Komponenten der nukleären ND10 Strukturen untersucht.

NF- κ B ist ein wichtiger zellulärer Transkriptionsfaktor, der neben einer Reihe anderer Prozesse auch an der Regulation der Immunantwort sowie an Entzündungsvorgängen beteiligt ist. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch den proteasomalen Abbau von I- κ B, dem zelleigenen Inhibitor von NF- κ B (siehe Abschnitt 1.5.2). Darüber hinaus trägt das Proteasom zur Aktivierung von NF- κ B bei, indem es die ko- oder post-translationale Abspaltung der p50-Untereinheit von NF- κ B aus dem p105-Vorläuferprotein katalysiert [Lin, 1998; Palombella, 1994]. Trotz seiner Bedeutung für die innate Immunantwort wird die vermutlich eher „passive“ Induktion von NF- κ B durch einige Viren nicht unterbunden und in manchen Fällen überdies zur Initiation der viralen Proteinexpression genutzt. So rekrutiert HSV-1 NF- κ B in der frühen Phase des Replikationszyklus zum viralen ICP0-Promotor [Amici, 2006], welcher ähnlich wie der MIE-Enhancer/Promotor von HCMV die Expression der IE-Proteine kontrolliert. Wird die HSV-1-induzierte Aktivierung von NF- κ B durch PI unterdrückt, so resultiert dies in der Hemmung der viralen Proteinexpression und der Virusreplikation [La Frazia, 2006]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der antivirale Effekt von PI im Falle von HSV-1 auf der Hemmung von NF- κ B beruht. Da auch der HCMV MIE-Enhancer/Promotor NF- κ B Bindestellen aufweist und NF- κ B als essentiell für die effiziente Transaktivierung des MIE-Enhancer/Promotors und die Expression von IE1 beschrieben wurde [DeMeritt, 2004], sollte in dieser

Arbeit aufgeklärt werden, ob der antivirale Effekt von PI im Falle von HCMV ebenfalls auf der Hemmung von NF- κ B beruht.

Dazu wurde zunächst die Hemmbarkeit der IE-Expression in RPE-Zellen untersucht. Eine Besonderheit von RPE-Zellen ist, dass die Virusreplikation in diesen Zellen nicht von NF- κ B Inhibitoren gehemmt werden kann [Cinatl Jr, 2001]. Dennoch konnte die IE1/2-Expression in RPE-Zellen durch MG132 signifikant reduziert werden (siehe Abb. 30). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Hypothese aufgestellt, dass der anti-HCMV-Effekt von PI nicht auf der Hemmung von NF- κ B beruht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde getestet, ob ein weiterer NF- κ B Inhibitor, SN50, einen ähnlichen Effekt auf die HCMV-Replikation hat wie MG132. Anders als PI hemmt SN50 jedoch nicht die Aktivierung, sondern den Kernimport von NF- κ B [Lin, 1995]. Die HCMV-Replikation wurde durch SN50 leicht beeinträchtigt (siehe Abb. 31), was dafür spricht, dass NF- κ B die Replikation zu stimulieren vermag. Dennoch war die HCMV-Replikation auch in Anwesenheit von SN50 sensitiv für MG132 (siehe Abb. 32). Es müssen folglich weitere Proteasom-abhängige Prozesse im viralen Replikationszyklus existieren, deren Hemmung kritisch für die Virusreplikation ist. Die Hypothese, dass der anti-HCMV-Effekt von PI unabhängig von der PI-vermittelten Hemmung der NF- κ B Aktivierung ist, wurde durch die Versuche mit SN50 somit weiter erhärtet.

Um die Rolle von NF- κ B noch detaillierter zu erforschen, wurde der Einfluss von PI auf die Replikation der Virusmutante HB5 Δ NF- κ B charakterisiert, bei welcher alle vier 18 bp-Motive im MIE-Enhancer/Promotor deletiert sind. Abgesehen von diesen Motiven gibt es im gesamten HCMV-Genom lediglich im US3-Promotor weitere putative Bindestellen für NF- κ B [Chan, 1996]. US3 ist ein sehr frühes Protein, welches zur HCMV-Immunevasion beiträgt, indem es die Reifung und den Transport von MHC Klasse-I und -II Molekülen zur Zelloberfläche verhindert [Hegde, 2002; Jones, 1996]. Für die Initiation der Virusreplikation spielt US3 jedoch keine Rolle. In Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass NF- κ B die HCMV-Replikation begünstigt, ist die Replikation der Mutante in HELF gegenüber dem Wildtyp HB5 um eine Größenordnung reduziert (S. Prösch, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe von Plaque-reduktionsassays konnte gezeigt werden, dass die Replikation der Mutante HB5 Δ NF- κ B gleichermaßen sensitiv gegenüber MG132 ist wie die des

Wildtyps HB5 (siehe Abb. 34). Die Bildung infektiöser Nachkommenviren konnte bei HB5 Δ NF- κ B ebenso wie bei HB5-GFP durch MG132 unterdrückt werden (siehe Abb. 35). Auch die MG132-vermittelte Hemmung der viralen Proteinexpression folgte bei HB5 Δ NF- κ B und HB5-GFP dem gleichen Muster (siehe Abb. 36).

Auch die Arbeiten anderer Gruppen haben entgegen der oben zitierten Arbeit von DeMeritt *et al.* gezeigt, dass NF- κ B keine essentielle Rolle bei der Initiation der viralen Replikation spielt. So wurde beschrieben, dass die Eliminierung der NF- κ B Bindestellen im MIE-Enhancer/Promotor keine Auswirkung auf die Expression von IE1 hat [Gustems, 2006]. Zudem hatte eine dominant-negative I- κ B Mutante keinen reprimierenden Einfluss auf die HCMV-Replikation [Benedict, 2004]. Der MIE-Enhancer/Promotor weist neben den Bindestellen für NF- κ B noch eine Vielzahl weiterer Bindemotive für andere Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise CREB/ATF, AP-1 und SP-1 auf. Es ist somit wahrscheinlich, dass andere Transkriptionsfaktoren den Mangel an NF- κ B – ob nun durch PI oder anderweitig herbeigeführt – kompensieren können.

Zusammenfassend zeigten die Experimente zur Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B somit, dass dieser zwar die Replikationseffizienz von HCMV zu fördern scheint. Die Hemmung der Aktivierung von NF- κ B spielt für den antiviralen Effekt von PI jedoch – wenn überhaupt – nur eine untergeordnete Rolle. Darüber hinaus müssen noch weitere Proteasom-abhängige Prozesse im viralen Replikationszyklus existieren.

Einer dieser Prozesse könnte die Auseinandersetzung des Virus mit den subnukleären ND10 Strukturen sein. Bei ND10 Domänen handelt es sich um makromolekulare Strukturen, die distinkte Areale im interchromosomalen Raum des Nukleus bilden und aus einer Vielzahl zellulärer Proteine bestehen [Negorev, 2001]. Zu den wichtigsten ND10 Komponenten zählen neben PML als dem ND10 definierenden Faktor vor allem die Proteine hDaxx, Sp100 und SUMO-1. Aufgrund der Fähigkeit von PML und hDaxx, zelluläre Histon-Deacetylasen (HDACs) zu viralen Genomen zu rekrutieren und diese dadurch transkriptional stillzulegen, werden ND10 als Teil der intrinsischen Immunabwehr der Zelle angesehen. Dennoch scheint die enge Assoziierung

von viralen Genomen und ND10 Domänen ein allgemeines Merkmal im Kern replizierender DNA-Viren zu sein. So assoziieren die parentalen Genome von Adenoviren, Papovaviren sowie allen Herpesviridae präferentiell mit ND10 Domänen; die Transkription der viralen Gene und die Bildung von Replikationszentren beginnen zumeist in unmittelbarer Nachbarschaft dieser Strukturen [Everett, 2001; Ishov, 1996; Maul, 1998; Maul, 1996]. Auf der anderen Seite kodieren viele der im Kern replizierenden DNA-Viren für Proteine, die früh im Replikationszyklus die Zerstörung der ND10 Domänen bewirken [Everett, 2001]. So induziert das sehr frühe HSV-Protein ICP0 den proteasomalen Abbau von PML und damit die Auflösung der ND10 Domänen [Chelbi-Alix, 1999; Everett, 1998]. Im Falle von HCMV werden die ND10 Strukturen nicht durch den Abbau von PML, sondern durch die IE1-vermittelte Dispersion von PML zerstört. Darüber hinaus induziert das Virion-assoziierte Protein pp71 den proteasomalen Abbau von hDaxx [Saffert, 2006]. Der Mechanismus, durch welchen pp71 hDaxx dem proteasomalen Abbau zuführt, ist noch nicht bekannt. pp71 scheint jedoch keine E3-Ligase zu sein, da gezeigt werden konnte, dass der Abbau von hDaxx Ubiquitin-unabhängig erfolgt [Hwang, 2007]. Für PML konnte bereits ein reprimierender Einfluss auf die Transkription der HCMV IE-Gene nachgewiesen werden [Tavalai, 2008; Tavalai, 2006]. Auch hDaxx wirkt als Repressor der viralen Transkription, indem es die Rekrutierung von HDACs zum MIE-Enhancer/Promotor vermittelt [Woodhall, 2006]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die pp71-vermittelte Neutralisation von hDaxx nötig ist, um die IE-Transkription zu initiieren [Saffert, 2006]. Wurde hDaxx durch PI stabilisiert, so konnte dadurch die Expression von IE1 bei niedriger, nicht jedoch bei hoher MOI unterdrückt werden. In den hier durchgeführten Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen konnte ebenfalls eine MOI-Abhängigkeit des Einflusses von PI auf die IE-Proteinexpression beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.2.7). Somit wurde postuliert, dass hDaxx und/oder PML in den anti-HCMV-Effekt von PI involviert sein könnten. Versuche mit Fibroblasten, in welchen die Expression von PML bzw. hDaxx durch spezifische siRNAs stabil ausgeschaltet ist, zeigten jedoch, dass die IE1-Expression auch in diesen Zellen sensitiv gegenüber MG132 war (siehe Abb. 37). Im Vergleich zu MG132-behandelten Kontrollzellen war jedoch vor allem in hDaxx-*knockdown* (hDaxx-kd) Zellen

eine partielle „Resistenz“ zu erkennen. Durch den *knockdown* wird hDaxx nicht mehr gebildet und folglich können PI die Initiation der Virusreplikation nur über andere Mechanismen als die Stabilisierung von hDaxx blockieren. Die partielle „Resistenz“ in hDaxx-kd Zellen deutet demnach darauf hin, dass die Stabilisierung von hDaxx einen Teil des anti-HCMV-Effekts von PI ausmacht, dass darüber hinaus jedoch noch andere Proteine in diesen Effekt involviert sind. Im Fall von PML ist bekannt, dass HCMV nur die Umverteilung, nicht aber den proteasomalen Abbau des Proteins induziert [Xu, 2001]. Dennoch war in MG132-behandelten PML-kd Zellen die Anzahl der IE1-positiven Zellen im Vergleich zu den MG132-behandelten Kontrollzellen leicht erhöht (siehe Abb. 37). hDaxx wird in PML-kd Zellen zwar normal exprimiert, ist jedoch durch die Abwesenheit der ND10 strukturgebenden Komponente PML diffus im Zellkern verteilt [Tavalai, 2006]. Interessanterweise erfolgt in HCMV-infizierten PML-kd Zellen jedoch eine Re-Organisation von hDaxx und Sp100 in ND10-ähnlichen Arealen, die mit IE2 ko-lokalisieren [Tavalai, 2006]. Es ist dennoch sehr wahrscheinlich, dass sich die ND10-ähnlichen Domänen in Struktur und Zusammensetzung deutlich von den „echten“ ND10 Domänen unterscheiden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass hDaxx in PML-kd Zellen nicht mehr in die benötigte räumliche Nähe zum viralen Genom kommt oder die Interaktion anderweitig wie z.B. durch das Fehlen eines Faktors gestört ist, wodurch die leichte „Resistenz“ gegenüber MG132 in PML-kd Zellen erklärt werden könnte.

Es ist ein allgemeines Merkmal von intrinsischen Immunantworten – zu denen die Repression der viralen Transkription durch hDaxx ja gehört –, dass sie gesättigt werden können [Bieniasz, 2004]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine MOI-Abhängigkeit des Effekts von PI auf die IE-Expression beobachtet werden. Eine Erklärung dafür könnte im Partikel/PFU-Verhältnis der Virusstocks zu finden sein. Neben infektiösen Viruspartikeln enthalten Virusstocks in der Regel defektive Viruspartikel wie beispielsweise NIEPs. Bei einer Infektion werden somit sowohl durch replikationskompetente Virionen als auch durch defektive Partikel Tegumentproteine in die Zelle eingebracht. So konnten Saffert *et al.* zeigen, dass bei einer MOI von 0.05 ca. 50% der Zellen positiv für pp71 waren [Saffert, 2006]. Es wäre denkbar, dass die

eingebraachte Menge an pp71 bei hoher MOI ausreichend ist, um den antiviralen Effekt von hDaxx zu neutralisieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung des Repressors hDaxx in MG132-behandelten Zellen zum anti-HCMV-Effekt von PI beiträgt. Da die antivirale Wirkung von hDaxx bei hoher MOI neutralisiert wird, die Virusreplikation jedoch trotzdem durch PI gehemmt werden kann, muss darüber hinaus die Existenz weiterer zellulärer oder viraler Zielproteine von PI angenommen werden. Ein möglicher Kandidat für ein zelluläres Zielprotein von PI wäre das Retinoblastoma-Protein (Rb). Kalejta *et al.* konnten zeigen, dass pp71 das Fortschreiten des Zellzyklus stimuliert, indem es den proteasomalen Abbau hypophosphorylierter Proteine der Rb-Familie induziert [Kalejta, 2003a]. Die Stimulation des Zellzyklus und der nachfolgende Arrest an der G₁/S-Grenze sind vorteilhaft für HCMV, da in dieser Phase des Zellzyklus alle benötigten Bausteine für die virale DNA-Replikation bereitgestellt werden, ohne dass sie für die zelluläre DNA-Replikation zum Einsatz kommen. Eine pp71-Virusmutante, die Rb nicht mehr abbauen kann, repliziert jedoch genauso effizient wie der Wildtyp [Cantrell, 2005], da HCMV den Zellzyklus über weitere Proteine wie beispielsweise IE2 beeinflussen kann [Petrik, 2006]. Da PI jedoch nicht nur zu einer Stabilisierung von Rb führen [Kalejta, 2003b], sondern auch die Expression von IE2 (zumindest bei niedriger MOI) reduzieren, wäre es denkbar, dass PI auf diese Weise zur hier beobachteten reduzierten HCMV DNA-Replikation beitragen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche identifizieren PI als antivirale Agenzien mit einem Wirkungsmechanismus, der sich von den herkömmlichen Virostatika gegen HCMV wie Ganciclovir, Cidofovir oder Foscarnet unterscheidet. Im Hinblick auf die Zunahme Ganciclovir-resistenter Stämme [Baldanti, 2003; Boivin, 2001] wäre der Einsatz einer Substanzklasse mit neuartigem Wirkungsmechanismus in der antiviralen Therapie vorteilhaft. Bisher beschränkt sich der klinische Einsatz von PI auf PS-341 (Bortezomib) zur Therapie des multiplen Myeloms. Für die Zulassung von PI zur Therapie weiterer onkologischer und inflammatorischer Indikationen werden jedoch derzeit klinische Studien durchgeführt. Obwohl für PI überraschend wenige

Nebenwirkungen beschrieben wurden, stellt die Hemmung des Proteasoms einen relativ unspezifischen Eingriff in eine zentrale zelluläre Maschinerie dar. Gesetzt den Fall, dass der anti-HCMV-Effekt von PI auf der Stabilisierung eines viralen oder zellulären Schlüsselproteins beruht, wäre es eine weitaus spezifischere Strategie, dieses Schlüsselprotein sowie die korrespondierende E3-Ligase zu identifizieren. Es wäre zwar denkbar, dass mehrere virale oder zelluläre Faktoren zum anti-HCMV-Effekt von PI beitragen. Möglicherweise ist jedoch einer dieser Faktoren kritisch für den Effekt. Gegen die entsprechende E3-Ligase könnten dann Inhibitoren entwickelt werden, die viel versprechende Kandidaten für eine hochspezifische anti-HCMV-Therapie mit wenigen Nebenwirkungen darstellen würden.

5 Zusammenfassung

Das zur Familie der Herpesviridae gehörige Humane Cytomegalievirus (HCMV) ist ein ubiquitäres Pathogen. Wie alle anderen Viren ist auch HCMV im Rahmen seiner Replikation essentiell auf den Metabolismus der Wirtszelle angewiesen und hat daher eine Vielzahl von Strategien entwickelt, zelluläre Systeme oder Signalwege zu beeinflussen, um seine eigene Vermehrung zu begünstigen. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) auf vielfältige Weise in die Replikation von HCMV involviert ist. So konnte zunächst gezeigt werden, dass die Chymotrypsin-ähnliche (CT-L) Proteasomaktivität in HCMV-infizierten Zellen signifikant erhöht ist. Um aufzuklären, ob die Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität auf der Induktion des Immunproteasoms beruht, wurde die Zusammensetzung des Proteasoms in HCMV-infizierten Zellen mittels Western Blot untersucht. Die Analysen ergaben, dass die Induktion des Immunproteasoms durch HCMV unterdrückt wird und das Proteasom in seiner konstitutiven Form vorliegt. Um einen ersten Hinweis darauf zu erhalten, in welcher Phase des Replikationszyklus die Erhöhung der CT-L Proteasomaktivität induziert wird, wurde eine Kinetik der Proteasomaktivität erstellt und eine „*time of addition*“-Studie mit Cycloheximid durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Erhöhung der CT-L Aktivität in der sehr frühen oder frühen Phase des viralen Replikationszyklus über einen noch unbekannten Mechanismus induziert wird.

Wurde die CT-L Proteasomaktivität durch Proteasominhibitoren (PI) wie z.B. MG132 blockiert, so hatte dies die Hemmung der HCMV-Replikation zur Folge. Der anti-HCMV-Effekt von PI war am stärksten ausgeprägt, wenn die Zugabe in der sehr frühen oder frühen Phase der Virusreplikation erfolgte. Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte zudem gezeigt werden, dass die Bildung infektiöser Nachkommenviren vollständig durch PI unterdrückt wird. Im Folgenden sollte untersucht werden, für welche Prozesse des viralen Replikationszyklus ein funktionell aktives Proteasom benötigt wird. Der Eintritt von HCMV in die Wirtszelle wurde nicht durch PI gehemmt. Die Charakterisierung des Einflusses von PI auf die Expression und Lokalisation

der viralen Proteine ergab, dass bei niedriger MOI (MOI 0.1) deutlich verringerte Mengen der sehr frühen Proteine IE1 und IE2 vorlagen, dieser Effekt jedoch bei hoher MOI (MOI ≥ 1) aufgehoben war. Die Expression früher Proteine wie z.B. der DNA-Replikationsfaktoren pUL44 und pUL112/113 war MOI-unabhängig reduziert. Anders als in den Kontrollzellen waren diese Proteine zudem nicht in Replikationszentren, sondern in Prä-Replikationszentren lokalisiert. Die Expression später Struktur- und Tegumentproteine war MOI-unabhängig vollständig unterdrückt, wodurch die Abwesenheit von Nachkommenviren in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erklärt werden kann. Mittels Pulsfeldgelelektrophorese konnte ferner gezeigt werden, dass PI mit der Spaltung konkatemerer viraler DNA interferieren. Studien mit dem Nukleosidanalogon Bromdesoxyuridin ergaben zudem, dass die *de novo* Synthese viraler DNA blockiert ist.

Um erste Hinweise auf den Wirkungsmechanismus von PI zu erhalten, wurde untersucht, ob der Transkriptionsfaktor NF- κ B oder zelluläre Transkriptionsrepressoren wie z.B. hDaxx am anti-HCMV-Effekt beteiligt sind. Durch die Charakterisierung der Replikation und Proteinexpression einer Virusmutante, bei welcher die NF- κ B-Bindestellen im MIE-Enhancer/Promotor deletiert sind, konnte gezeigt werden, dass der antivirale Effekt von PI nicht auf der Hemmung der Aktivierung von NF- κ B beruht. Experimente mit hDaxx-*knockdown* Zellen deuteten hingegen darauf hin, dass die Stabilisierung des Transkriptionsrepressors hDaxx zumindest partiell zum anti-HCMV-Effekt von PI beiträgt. Darüber hinaus müssen jedoch weitere virale oder zelluläre Zielproteine existieren, deren Beeinflussung durch PI kritisch für die Virusreplikation ist.

Zusammenfassend stellt das Proteasom somit einen neu identifizierten potentiellen Angriffspunkt für die anti-HCMV-Therapie dar.

Literatur

- Adair, R., Liebisch, G.W., Lerman, B.J., and Colberg-Poley, A.M. (2006): Human cytomegalovirus temporally regulated gene expression in differentiated, immortalized retinal pigment epithelial cells, *J Clin Virol* 35, pp. 478-484.
- Ahn, J.H., Jang, J.W., and Hayward, G.S. (1999): The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10), *J Virol* 73 [12], pp. 10458-10471.
- Ahn, J.H., Jang, W.J., and Hayward, G.S. (1999): The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10), *J Virol* 73, pp. 10458-10471.
- Amici, C., Rossi, A., Costanzo, A., Ciafrè, S., Marinari, B., Balsamo, M., Levrero, M., and Santoro, M.G. (2006): Herpes simplex virus disrupts NF-kappaB regulation by blocking its recruitment on the IkappaBalpha promoter and directing the factor on viral genes, *J Biol Chem* 281, pp. 7110-7117.
- Andreoni, M., Faircloth, M., Vulger, L., and Britt, W.J. (1989): A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus, *J Virol* 23, pp. 157-167.
- Arendt, C.S., and Hochstrasser, M. (1997): Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, pp. 7156-7161.
- Baldanti, F., and Gerna, G. (2003): Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs: diagnosis, monitoring and clinical impact, *J Antimicrob Chemother* 52, pp. 324-330.
- Balfour Jr., H.H. (1979): Cytomegalovirus: the troll of transplantation, *Arch Int Med* 139, p. 280.
- Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Chee, M.S., Hutchison, C.A. 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., and Preddie, E. (1991): The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome, *DNA Seq* 2, pp. 1-12.
- Banks, L., Pim, D., and Thomas, M. (2003): Viruses and the 26S proteasome: hacking into destruction, *Trends Biochem Sci* 28, pp. 452-459.
- Baxter, M.K., and Gibson, W. (2001): Cytomegalovirus basic phosphoprotein (pUL32) binds to capsids in vitro through its amino one-third, *J Virol* 75, pp. 6865-6873.
- Benedict, C.A., Angulo, A., Patterson, G., Ha, S., Huang, H., Messerle, M., Ware, C.F., and Ghazal, P. (2004): Neutrality of the canonical NF-kappaB-dependent pathway for human and murine cytomegalovirus transcription and replication in vitro, *J Virol* 78, pp. 741-750.
- Bieniasz, P.D. (2004): Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack, *Nat Immunol* 5, pp. 1109-1115.
- Bodaghi, B., Jones, T.R., Zipeto, D., Vita, C., Sun, L., Laurent, L., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., and Michelson, S. (1998): Chemokine

- sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells, *J Exp Med* 188, pp. 855-866.
- Bogner, E., Radsak, K., and Stinski, M.F. (1998): The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity, *J Virol* 72, pp. 2259-2264.
- Boivin, G., Gilbert, C., Gaudreau, A., Greenfield, I., Sudlow, R., and Roberts, N.A. (2001): Rate of emergence of cytomegalovirus (CMV) mutations in leukocytes of patients with acquired immunodeficiency syndrome who are receiving valganciclovir as induction and maintenance therapy for CMV retinitis, *J Infect Dis* 184, pp. 1598-1602.
- Bold, S., Ohlin, M., Garten, W., and Radsak, K. (1996): Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B- mediated cell-cell fusion, *J Gen Virol* 77, pp. 2297-2302.
- Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H., and Messerle, M. (1999): Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants, *J Virol* 73, pp. 8320-8329.
- Bose, S., Mason, G.G., and Rivett, A.J. (1999): Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells, *Mol Biol Rep* 26, pp. 11-14.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., and Schaffner, W. (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus, *Cell* 41, pp. 521-530.
- Botero, J.E., Contreras, A., and Parra, B. (2008): Profiling of inflammatory cytokines produced by gingival fibroblasts after human cytomegalovirus infection, *Oral Microbiol Immunol* 23, pp. 291-298.
- Boyle, K.A., and Compton, T. (1998): Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B, *J Virol* 72, pp. 1826-1833.
- Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, pp. 248-254.
- Bresnahan, W.A., and Shenk, T.E. (2000): UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, pp. 14506-14511.
- Britt, W.J., and Auger, D. (1985): Identification of a 65 000 dalton virion envelope protein of human cytomegalovirus, *Virus Res* 4, pp. 31-36.
- Britt, W.J., Pass, R.F., Stagno, S., and Alford, C.A. (1991): Pediatric Cytomegalovirus infection, *Transplant Proc* 23, pp. 115-117.
- Browne, E.P., and Shenk, T. (2003): Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 100, pp. 11439-11444.
- Callahan, M.K., Wohlfert, E.A., Ménoret, A., and Srivastava, P.K. (2006): Heat shock up-regulates Imp2 and Imp7 and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes, *J Immunol* 177, pp. 8393-8399.
- Cantrell, S.R., and Bresnahan, W.A. (2005): Interaction between the human cytomegalovirus UL82 gene product (pp71) and hDaxx regulates immediate-early gene expression and viral replication, *J Virol* 79, pp. 7792-7802.

- Chan, Y.J., Tseng, W.P., and Hayward, G.S. (1996): Two distinct upstream regulatory domains containing multicopy cellular transcription factor binding sites provide basal repression and inducible enhancer characteristics to the immediate-early IES (US3) promoter from human cytomegalovirus, *J Virol* 70, pp. 5312-5328.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994): Identification of herpesvirus-like DNA sequence in AIDS-associated Kaposi's sarcoma, *Science* 266, pp. 1865-1869.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Hornsnell, T., Hutchinson, I., Kouzarides, T., Martignetti, J., Preddie, E., Satchwell, S., Tomlison, P., Weston, K., and Barrell, B. (1990): Analysis of the protein-coding content of the sequence of Human Cytomegalovirus strain AD169, *Curr Top Microbiol Immunol* 154, pp. 125-169.
- Chelbi-Alix, M.K., and de Thé, H. (1999): Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins, *Oncogene* 18, pp. 935-941.
- Chen, W., Norbury, C.C., Cho, Y., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2001): Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens, *J Exp Med* 193, pp. 1319-1326.
- Cherrington, J.M., and Mocarski, E.S. (1989): Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element, *J Virol* 63, pp. 1435-1440.
- Cherrington, J.M., Khoury, E.L., and Mocarski, E.S. (1991): Human cytomegalovirus ie2 negatively regulates alpha gene expression via a short target sequence near the transcription start site, *J Virol* 65, pp. 887-896.
- Cheung, T.W., and Teich, S.A. (1999): Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection, *Mt Sinai J Med* 66, pp. 113-124.
- Child, S.J., Hakki, M., De Niro, K.L., and Geballe, A.P. (2004): Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1, *J Virol* 78, pp. 197-205.
- Chrisp, P., and Clissold, S.P. (1991): Foscarnet: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and the therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis, *Drugs* 41, pp. 104-129.
- Ciechanover, A. (2005): Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, pp. 79-87.
- Cinatl Jr, J., Margraf, S., Vogel, J.U., Scholz, M., Cinatl, J., and Doerr, H.W. (2001): Human cytomegalovirus circumvents NF-kappa B dependence in retinal pigment epithelial cells, *J Immunol* 167, pp. 1900-1908.
- Cohen, J.I., and Corey, G.R. (1985): Cytomegalovirus infection in the normal host, *Medicine (Baltimore)* 64, pp. 100-114.
- Compton, T., Nowlin, D.M., and Cooper, N.R. (1993): Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate, *Virology* 193, pp. 834-841.
- Conaway, R.C., Brower, C.S., and Conaway, J.W. (2002): Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation, *Science* 17, pp. 1254-1258.

- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L. (1996): Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu Rev Biochem* 65, pp. 2165-2171.
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C.F., Fenteany, G., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (1997): Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation, *J Biol Chem* 272, pp. 13437-13445.
- Crumpacker, C.S. (1996): Ganciclovir, *Drug Ther* 335, pp. 721-729.
- Curran, M., and Noble, S. (2001): Valganciclovir, *Drugs* 61, pp. 1145-1150.
- Dantuma, N.P., and Masucci, M.G. (2003): The ubiquitin/proteasome system in Epstein-Barr virus latency and associated malignancies, *Semin Cancer Biol* 13, pp. 69-76.
- de Bruyn Kops, A., Uprichard, S.L., Chen, M., and Knipe, D.M. (1998): Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions, *Virology* 252, pp. 162-178.
- Delboy, M.G., Roller, D.G., and Nicola, A.V. (2008): Cellular proteasome activity facilitates herpes simplex virus entry at a postpenetration step, *J Virol* 82, pp. 3381-3390.
- DeMeritt, I.B., Milford, L.E., and Yurochko, A.D. (2004): Activation of the NF- κ B Pathway in Human Cytomegalovirus-Infected Cells Is Necessary for Efficient Transactivation of the Major Immediate Early-Promoter, *J Virol* 78, pp. 4498-4507.
- Demmler, G.J. (1991): Infectious diseases society of America and centers of disease control. Summary of a surveillance for congenital cytomegalovirus disease, *Rev Infect Dis* 13, pp. 315-329.
- Depto, A.S., and Sternberg, R.M. (1989): Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene: octamer sequence in the promoter is required for activation by viral gene products, *J Virol* 63, pp. 1232-1238.
- Deray, G.F., Martinez, F., Katlama, C., Levatier, B., Beaufils, H., Danis, M., Rosenheim, M., Baumelou, M., Dohin, M., Gentilini, M., and Jocabos, C. (1989): Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention, *Am J Nephrol* 9, pp. 316-320.
- Detrick, B., Rhame, J., Wang, Y., Nagineni, C.N., and Hooks, J.J. (1996): Cytomegalovirus replication in human retinal pigment epithelial cells. Altered expression of viral early proteins, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, pp. 814-825.
- Dittmer, A., and Bogner, E. (2005a): Analysis of the quaternary structure of the putative HCMV portal protein pUL104, *Biochemistry* 44, pp. 759-765.
- Dittmer, A., Drach, J.C., Townsend, L.B., Fischer, A., and Bogner, E. (2005b): Interaction of the putative human cytomegalovirus portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by benzimidazole-D-ribonucleosides, *J Virol* 79, pp. 14660-14667.
- Döcke, W.D., Prösch, S., Fietze, E., Kimel, V., Zuckermann, H., Kluge, H., Syrbe, U., Krüger, D.H., von Baehr, R., and Volk, H.D. (1994): Cytomegalovirus reactivation and tumor necrosis factor- α , *Lancet* 343, pp. 268-269.
- Drexler, H.C. (1997): Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, pp. 855-860.

- Drexler, H.C., Risau, W., and Konerding, M.A. (2000): Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells, *FASEB J* 14, pp. 65-77.
- Eggers, M., Radsak, K., Enders, G., and Reschke, M. (2001): Use of recombinant glycoprotein antigens gB and gH for diagnosis of primary human cytomegalovirus infection during pregnancy, *J Med Virol* 63, pp. 135-142.
- Eleuteri, A.M., Kohanski, R.A., Cardozo, C., and Orlowski, M. (1997): Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2 and MECL1 and changes in properties and specificity, *J Biol Chem* 272, pp. 11824-11831.
- Elliott, P.J., Zollner, T.M., and Boehncke, W.-H. (2003): Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy, *J Mol Med* 81, pp. 235-245.
- Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1965): Morphological and biological studies on a virus in cultured Lymphoblasts from Burkitt's lymphoma, *J Exp Med* 121, pp. 761-770.
- Erice, A. (1999): Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs, *Clin Microbiol Rev* 12, pp. 286-297.
- Everett, R.D. (2001): DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies, *Oncogene* 20, pp. 7266-7273.
- Everett, R.D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1998): The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms, *J Virol* 72, pp. 6581-6591.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., and Schreiber, S.L. (1995): Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin, *Science* 268, pp. 726-731.
- Fiala, M., Honess, R.W., Heiner, D.C., Heine Jr., J.W., Murnane, J., Wallace, R., and Guze, L.B. (1976): Cytomegalovirus proteins. Polypeptides of virions and dense bodies, *J Virol* 19, pp. 243-254.
- Figueiredo-Pereira, M.E., Banik, N., and Wilk, S. (1994): Comparison of the effect of calpain inhibitors on two extralysosomal proteinases: the multicatalytic proteinase complex and m-calpain, *J Neurochem* 62, pp. 1989-1994.
- Forbes, B.A. (1989): Acquisition of cytomegalovirus infection: an update, *Clin Microbiol Rev* 2, pp. 204-216.
- Frenkel, N., Schirmer, E.C., Wyatt, L.S., Katsafanas, G., Roffman, E., Danovich, R.M., and June, C.H. (1990): Isolation of a new herpesvirus from human CD4+T cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 87, pp. 748-752.
- Friabley, A., and Wang, C.Y. (2006): Proteasome inhibitor induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress, *Cancer Biol Ther* 5, pp. 745-748.
- Fuertes, G., Martin De Llano, J.J., Villarroya, A., Rivett, A.J., and Knecht, E. (2003): Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions, *Biochem J* 375, pp. 75-86.
- Gawn, J.M., and Greaves, R.F. (2002): Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a

- broad block to viral delayed-early gene expression, *J Virol* 76, pp. 4441-4455.
- Geballe, A.P., Leach, F.S., and Mocarski, E.S. (1986): Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranscriptional events, *J Virol* 57, pp. 864-874.
- Giesen, K., Radsak, K., and Bogner, E. (2000): Targeting of the gene product encoded by ORF UL56 of human cytomegalovirus into viral replication centers, *FEBS Lett* 471, pp. 215-218.
- Greaves, R.F., and Mocarski, E.S. (1998): Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant, *J Virol* 72, pp. 366-379.
- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T.P., Schild, H., Rammensee, H.G., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P.M. (1996): A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation, *Nature* 381, pp. 166-168.
- Groettrup, M., Standera, S., Stohwasser, R., and Kloetzel, P.M. (1997): The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, pp. 8970-8975.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature* 386, pp. 463-471.
- Gustems, M., Borst, E., Benedict, C.A., Peres, C., Messerle, M., Ghazal, P., and Angulo, A. (2006): Regulation of the transcription and replication cycle of human cytomegalovirus is insensitive to genetic elimination of the cognate NF-kappaB binding sites in the enhancer, *J Virol* 80, pp. 9899-9904.
- Gustems, M., Borst, E., Benedict, C.A., Peres, C., Messerle, M., Ghazal, P., and Angulo, A. (2006): Regulation of the transcription and replication cycle of human cytomegalovirus is insensitive to genetic elimination of the cognate NF-kappaB binding sites in the enhancer, *J Virol* 80 [19], pp. 9899-9904.
- Harty, R.N., Brown, M.E., McGettigan, J.P., Wang, G., Jayakar, H.R., Huibregtse, J.M., Whitt, M.A., and Schnell, M.J. (2001): Rhabdoviruses and the Cellular Ubiquitin-Proteasome System: a Budding Interaction, *J Virol* 75, pp. 10623-10629.
- Hegde, N.R., Tomazin, R.A., Wisner, T.W., Dunn, C., Boname, J.M., Lewinsohn, D.M., and Johnson, D.C. (2002): Inhibition of HLA-DR assembly, transport, and loading by human cytomegalovirus glycoprotein US3: a novel mechanism for evading major histocompatibility complex class II antigen presentation, *J Virol* 76, pp. 10929-10941.
- Heider, J.A., Bresnahan, W.A., and Shenk, T.E. (2002): Construction of a rationally designed human cytomegalovirus variant encoding a temperature-sensitive immediate-early 2 protein, *Proc Natl Acad Sci USA* 99, pp. 3141-3146.
- Hemelaar, J., Bex, F., Booth, B., Cerundolo, V., McMichael, A., and Daenke, S. (2001): Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein binds to assembled nuclear proteasomes and enhances their proteolytic activity, *J Virol* 75, pp. 11106-11115.

- Hitchcock, M.J.M., Jaffe, H.S., Martin, J.C., and Stagg, R.J. (1996): Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity, *Antivir Chem Chemother* 7, pp. 115-127.
- Huang, E.S., Chen, S.T., and Pagano, J.S. (1973): Human Cytomegalovirus. Purification and characterization of viral DNA, *J Virol* 12, pp. 1473-1481.
- Huber, M.T., and Compton, T. (1998): The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex, *J Virol* 72, pp. 8191-8197.
- Hwang, J., and Kalejta, R.F. (2007): Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells, *Virology* 367, pp. 334-338.
- Hwang, J.S., and Bogner, E. (2001): ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus, *J Biol Chem* 277, pp. 6943-6948.
- Irmiere, A., and Gibson, W. (1983): Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus, *Virology* 130, pp. 118-133.
- Isaacson, M.K., Feire, A.L., and Compton, T. (2007): Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling, *J Virol* 81, pp. 6241-6247.
- Ishov, A.M., and Maul, G.G. (1996): The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition, *J Cell Biol* 134, pp. 815-826.
- Jones, T.R., Wiertz, E.J., Sun, L., Fish, K.N., Nelson, J.A., and Ploegh, H.L. (1996): Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, pp. 11327-11333.
- Josephs, S.F., Salahddin, S.Z., Ablashi, D.V., Schachter, F., Wong-Staal, F., and Gallo, R.C. (1986): Genomic analysis of the Human B-Lymphotropic Virus (HBLV), *Science* 234, pp. 601-603.
- Juckem, L.K., Boehme, K.W., Feire, A.L., and Compton, T. (2008): Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells, *J Immunol* 180, pp. 4965-4977.
- Kalejta, R.F., and Shenk, T. (2002): Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus, *Front Biosci* 7, pp. 295-306.
- Kalejta, R.F., and Shenk, T. (2003b): Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein, *Proc Natl Acad Sci USA* 100, pp. 3263-3268.
- Kalejta, R.F., Bechtel, J.T., and Shenk, T. (2003a): Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors, *Mol Cell Biol* 23, pp. 1885-1895.
- Kari, B., and Gehrz, R. (1992): A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope, *J Virol* 66, pp. 1761-1764.
- Kari, B., and Gehrz, R. (1993): Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II, *J Gen Virol* 74, pp. 255-264.

- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity, *Annu Rev Immunol* 18, pp. 621-663.
- Kaspari, M., Tavalai, N., Stamminger, T., Zimmermann, A., Schilf, R., and Bogner, E. (2008): Proteasome inhibitor MG132 blocks viral DNA replication and assembly of human cytomegalovirus, *FEBS Lett* 582, pp. 666-672.
- Khan, S., Zimmermann, A., Basler, M., Groettrup, M., and Hengel, H. (2003): A Cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction, *J Virol* 78, pp. 1831-1842.
- Khor, R., McElroy, L.J., and Whittaker, G.R. (2003): The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of influenza virus into host cells, *Traffic* 4, pp. 857-868.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Castillo, V., and Goldberg, A.L. (1999): Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown, *Mol Cell* 4, pp. 395-402.
- Kisselev, A.F., and Goldberg, A.L. (2001): Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates, *Chem Biol* 8, pp. 739-758.
- Klemola, E. (1973): Cytomegalovirus infection in previously healthy adults, *Ann Intern Med* 79, pp. 267-268.
- La Frazia, S., Mici, C. and Santoro, M.G. (2006): Antiviral activity of proteasome inhibitors in herpes simplex virus-1 infection: role of nuclear factor- κ B, *Antiviral Ther* 11, pp. 995-1004.
- La Frazia, S., Mici, C., and Santoro, M.G. (2006): Antiviral activity of proteasome inhibitors in herpes simplex virus-1 infection: role of nuclear factor- κ B, *Antivir Ther* 11, pp. 995-1004.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head proteins of bacteriophage T4, *Nature* 227, pp. 680-685.
- LaMorte, V.J., Dyck, J.A., Ochs, R.L., and Evans, R.M. (1998): Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, pp. 4991-4996.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (2003): The human cytomegalovirus, *Pharmacol Ther* 98, pp. 269-297.
- Li, L., Nelson, J.A., and Britt, W.J. (1997): Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex, *J Virol* 71, pp. 3090-3097.
- Li, Q., and Verma, I.M. (2002): NF- κ B regulation in the immune system, *Nat Rev Immunol* 2, pp. 725-734.
- Lin, L., DeMartino, G.N., and Greene, W.C. (1998): Cotranslational biogenesis of NF- κ B p50 by the 26S proteasome, *Cell* 92, pp. 819-828.
- Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R., and Hawiger, J. (1995): Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence, *J Biol Chem* 270, pp. 14255-14258.
- Liu, B., and Stinski, M.F. (1992): Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cisacting elements, *J Virol* 66, pp. 4434-4444.
- Liu, C.W., Corboy, M.J., DeMartino, G.N., and Thomas, P.J. (2003): Endoproteolytic activity of the proteasome, *Science* 299, pp. 408-411.

- Lopper, M., and Compton, T. (2004): Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion, *J Virol* 78, pp. 8333-8341.
- Lukonis, C.J., and Weller, S.K. (1996): Characterization of nuclear structures in cells infected with herpes simplex virus type 1 in the absence of viral DNA replication, *J Virol* 70, pp. 1751-1758.
- Luo, H., Zhang, J., Cheung, C., Suarez, A., McManus, B.M., and Yang, D. (2003): Proteasome Inhibition Reduces Coxsackievirus B3 Replication in Murine Cardiomyocytes, *Am J Path* 163, pp. 381-385.
- Lurain, N.S., Spafford, L.E., and Thompson, K.D. (1994): Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir, *J Virol* 68, pp. 4427-4431.
- Mach, M., Kropff, B., Dal Monte, P., and Britt, W. (2000): Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73), *J Virol* 74, pp. 11881-11892.
- Marchini, A., Liu, H., and Zhu, H. (2001): Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes, *J Virol* 75, pp. 1870-1878.
- Mason, G.G., Hendil, K.B., and Rivett, A.J. (1996): Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity, *Eur J Biochem* 238, pp. 453-462.
- Masucci, M.G. (2001): Epstein-Barr virus oncogenesis and the ubiquitin-proteasome system, *Oncogene* 23, pp. 2107-2115.
- Maul, G.G. (1998): Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication, *Bioessays* 20, pp. 660-667.
- Maul, G.G., Ishov, A.M., and Everett, R.D. (1996): Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1, *Virology* 217, pp. 67-75.
- Meier, J.L., and Stinski, M.F. (1996): Regulation of human cytomegalovirus immediate early gene expression, *Intervirology* 39, pp. 331-342.
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., and Kloetzel, P.M. (2003): Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes, *J Biol Chem* 278, pp. 21517-21525.
- Mellgren, R.L. (1997): Specificities of cell permeant peptidyl inhibitors for the proteinase activities of mu-calpain and the 20 S proteasome, *J Biol Chem* 272, pp. 29899-29903.
- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H.B., Eloffson, M., Sin, N., and Crews, C.M. (1999): Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo anti-inflammatory activity, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, pp. 10403-10408.
- Mercorelli, B., Sinigaglia, E., Loregian, A., and Palù, G. (2008): Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs, *Rev Med Virol* 18, pp. 177-210.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennet, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., and Rao, A. (1997): IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation, *Science* 278, pp. 860-866.

- Mersseman, V., Böhm, V., Holtappels, R., Deegen, P., Wolfrum, U., Plachter, B., and Reyda, S. (2008): Refinement of strategies for the development of a human cytomegalovirus dense body vaccine, *Med Microbiol Immunol* 197, pp. 97-107.
- Mettenleiter, T.C. (2002): Herpesvirus assembly and egress, *J Virol* 76, pp. 1537-1547.
- Meyer, H.H., Ripalti, A., Landini, M.P., Radsak, K., Kern, H.F., and Hensel G.M. (1997): Human cytomegalovirus late-phase maturation is blocked by stably expressed UL32 antisense mRNA in astrocytoma cells, *J Gen Virol* 78, pp. 2621-2631.
- Mocarski, E.S., and Courcelle, C.T. (2001): Cytomegaloviruses and their replication, Knipe, D.M., and Howley, P.M., *Fields Virology* pp. 2629-2673, Lippincott, Philadelphia.
- Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Lyle, J.M., and Greaves R.F. (1996): A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, pp. 11321-11326.
- Morin, J., Johann, S., O'Hara, B., and Gluzman, Y. (1996): Exogenous thymidine is preferentially incorporated into human cytomegalovirus DNA in infected human fibroblasts, *J Virol* 70, pp. 6402-6404.
- Myung, J., Kim, K.B., and Crews, C.M. (2001): The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors, *Med Res Rev* 21, pp. 245-273.
- Negorev, D., and Maul, G.G. (2001): Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot, *Oncogene* 20, pp. 7234-7242.
- Neznanov, N., Dragunsky, E.M., Chumakov, K.M., Neznanova, L., Wek, R.C., Gudkov, A.V., and Banerjee, A.K. (2008): Different effect of proteasome inhibition on vesicular stomatitis virus and poliovirus replication, *PLoS ONE* 3, p. e1887.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., and Maniatis, T. (1994): The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B, *Cell* 78, pp. 773-785.
- Pari, G.S., and Anders, D.G. (1993): Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication, *J Virol* 67, pp. 6979-6988.
- Park, M.Y., Kim, Y.E., Seo, M.R., Lee, J.R., Lee, C.H., and Ahn, J.H. (2006): Interactions among four proteins encoded by the human cytomegalovirus UL112-113 region regulate their intranuclear targeting and the recruitment of UL44 to prereplication foci, *J Virol* 80, pp. 2718-2727.
- Pass, R.F. (2001): Cytomegalovirus, Knipe, D.M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B. and Straus, S. E., *Fields Virology* pp. 2675-2705, Raven Press, New York.
- Penfold, M.E., and Mocarski, E.S. (1997): Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis, *Virology* 239, pp. 46-61.
- Petrik, D.T., Schmitt, K.P., and Stinski, M.F. (2006): Inhibition of cellular DNA synthesis by the human cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication, *J Virol* 80, pp. 3872-3883.

- Plachter, B., Sinzger, C., and Jahn, G. (1996): Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus, *Adv Virus Res* 46, pp. 195-261.
- Prösch, S., Priemer, C., Höflich, C., Liebenthal, C., Babel, N., Krüger, D.H., and Volk, H.-D. (2003): Proteasome inhibitors: a novel tool to suppress human cytomegalovirus replication and virus-induced immune modulation, *Antivir Ther* 8, pp. 555-567.
- Prösch, S., Priemer, C., Höflich, C., Liebenthal, C., Babel, N., Krüger, D.H., and Volk, H.D. (2003): Proteasome inhibition: a novel tool to suppress human cytomegalovirus replication and virus-induced immune modulation, *Antiviral Ther* 8, pp. 555-567.
- Prösch, S., Staak, K., Stein, J., Liebenthal, C., Stamminger, T., Volk, H.D. and Krüger, D.H. (1995): Stimulation of Human Cytomegalovirus IE Enhancer/Promoter in HL60 Cells by TNF α is Mediated via Induction of NF- κ B, *Virology* 208, pp. 197-206.
- Prösch, S., Wendt, C.E.C., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Krüger, D.H., Volk, H.D., and Döcke, W.D. (2000): A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation, *Virology* 272, pp. 357-365.
- Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hübinger, A., and Reschke, M. (1996): Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment, *Arch Virol* 141, pp. 557-572.
- Reschke, M., Reis, B., Noding, K., Rohsiepe, D., Richter, A., Mockenhaupt, T., Garten, W., and Radsak, K. (1995): Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains, *J Gen Virol* 76, pp. 113-122.
- Revello, M.G., Zavattoni, M., Furione, M., Lilleri, D., Gorini, G., and Gerna, G. (2002): Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections, *J Infect Dis* 186, pp. 553-557.
- Rivett, A.J., and Hearn, A.R. (2004): Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, peptide production and interaction with viral proteins, *Curr Protein Pept Sci* 5, pp. 153-161.
- Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1999): Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides, *Annu Rev Immunol* 17, pp. 739-779.
- Roizmann, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., and Studdert, M.J. (1992): The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, *Arch Virol* 123, pp. 425-449.
- Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C., and Huebner, R.J. (1956): Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids, *Proc Soc Exp Biol Med* 92, pp. 418-424.
- Rowshani, A.T., Bemelman, F.J., van Leeuwen, E.M., van Lier, R.A., and ten Berge, I.J. (2005): Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients, *Transplantation* 79, pp. 381-386.

- Ryckman, B.J., Jarvis, M.A., Drummond, D.D., Nelson, J.A., and Johnson, D.C. (2006): Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion, *J Virol* 80, pp. 710-722.
- Saffert, R.T., and Kalejta, R.F. (2006): Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression, *J Virol* 80, pp. 3863-3871.
- Sanchez, V., Greis, K.D., Sztul, E., and Britt, W.J. (2000): Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly, *J Virol* 74, pp. 975-986.
- Sarov, I., and Abady, I. (1975): The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies, *Virology* 66, pp. 464-473.
- Scheffczik, H., Savva, C.G., Holzenburg, A., Kolesnikowa, L., and Bogner, E. (2002): The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure, *Nucleic Acids Res* 30, pp. 1695-1703.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53, *Cell* 75, pp. 495-505.
- Schleiss, M.R., and Heineman, T.C. (2005): Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines, *Expert Rev Vaccines* 4, pp. 381-406.
- Schneeweis, K.E. (1962): Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis, *Z Immunitätsforsch Exp Ther* 124, pp. 24-48.
- Schubert, U., Ott, D.E., Chertova, E.N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M.F., Bennink, J.R., Kräusslich, H.-G., and Yewdell, J.W. (2000): Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release and maturation of HIV-1 and HIV-2, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, pp. 13057-13062.
- Sheaff, R.J., Singer, J.D., Swanger, J., Smitherman, M., Roberts, J.M., and Clurman, B.E. (2000): Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination, *Mol Cell* 5, pp. 403-410.
- Shin, E.C., Seifert, U., Kato, T., Rice, C.M., Feinstone, S.M., Klotzel, P.M., and Rehmann, B. (2006): Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection, *J Clin Invest* 116, pp. 3006-3014.
- Silva, M.C., Yu, Q.C., Enquist, L., and Shenk, T. (2003): Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids, *J Virol* 77, pp. 10594-10605.
- Silverman, N., and Maniatis, T. (2001): NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity, *Genes Dev* 15, pp. 2321-2342.
- Sinzger, C. (2008): Entry route of HCMV into endothelial cells, *J Clin Virol* 41, pp. 174-179.

- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H., and Jahn, G. (1995): Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues, *J Gen Virol* 76, pp. 741-750.
- Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B., and Jahn, G. (2000): Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus, *J Gen Virol* 81, pp. 3021-3035.
- Smith, M.G. (1956): Propagation in tissue cultures of a cythopathogenic virus from human Salivary Gland Virus (SGV) disease, *Proc Soc Exp Biol* 92, pp. 424-430.
- Soroceanu, L., Akhavan, A., and Cobbs, C.S. (2008): Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection, *Nature* 455, pp. 391-395.
- Sourvinos, G., Tavalai, N., Berndt, A., Spandidos, D.A., and Stamminger, T. (2007): Recruitment of human cytomegalovirus immediate-early 2 protein onto parental viral genomes in association with ND10 in live-infected cells, *J Virol* 81, pp. 10123-10136.
- Spaete, R.R., and Mocarski, E.S. (1985): Regulation of cytomegalovirus gene expression: alpha and beta promoters are trans activated by viral functions in permissive human fibroblasts, *J Virol* 56, pp. 135-143.
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemain, M.C., Schindler, C., et al. (1995): Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element, *Oncogene* 11, pp. 2565-2573.
- Stinski, M.F., Thomson, D.R., and Wathen, M.N. (1981): Structure and Function of the cytomegalovirus genome, Nahamias, S.J., Dowle, W.R., and Schinazi, R.F., *The Human Herpesviruses*, Elsevier, New York.
- Strack, B., Calistri, A., Accola, M.A., Palu, G., and Gottlinger, H.G. (2000): A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, pp. 13063-13068.
- Takahashi, M., Okuno, Y., Otsuka, T., Osame, J., and Takamizawa, A. (1975): Development of a live attenuated varicella vaccine, *Biken J* 18, pp. 25-33.
- Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., and Stamminger, T. (2008): Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection, *J Virol* 82, pp. 126-137.
- Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Leis, M., and Stamminger, T. (2006): Evidence for a Role of the Cellular ND10 Protein PML in Mediating Intrinsic Immunity against Human Cytomegalovirus Infections, *J Virol* 80, pp. 8006-8018.
- Taylor, T.J., McNamee, E.E., Day, C., and Knipe, D.M. (2003): Herpes simplex virus replication compartments can form by coalescence of smaller compartments, *Virology* 309, pp. 232-247.
- Thomsen, D.R., Stenberg, R.M., Goins, W.F., and Stinski, M.F. (1984): Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus, *Proc Natl Acad Sci USA* 81, pp. 659-663.

- Toes, R.E., Nussbaum, A.K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N.P., Kraft, M., Laplace, C., Zwiderman, A., Dick, T.P., Müller, J., Schönfisch, B., Schmid, C., Fehling, H.J., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Schild, H. (2001): Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products, *J Exp Med* 194, pp. 1-12.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., and Kern, H. (1993): Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes, *Eur J Cell Biol* 60, pp. 163-178.
- Tsubuki, S., Saito, Y., Tamioka, M., Ito, H., and Kawashima, S. (1996): Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of dileucine and tri-leucine, *J Biochem* 119, pp. 572-576.
- Ustrell, V., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1995): Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases, *Proc Natl Acad Sci USA* 92, pp. 584-588.
- Varshavsky, A. (1997): The ubiquitin system, *Trends Biochem Sci* 22, pp. 383-387.
- Wade, M., Kowalik, T.F., Mudryj, M., Huang, E.S., and Azizkhan, J.C. (1992): E2F mediates dihydrofolate reductase promoter activation and multiprotein complex formation in human cytomegalovirus infection, *Mol Cell Biol* 12, pp. 4364-4374.
- Wang, X., Huang, D.Y., Huong, S.M., and Huang, E.S. (2005): Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus, *Nat Med* 11, pp. 515-521.
- Wang, X., Huong, S.M., Chiu, M.L., Raab-Traub, N., and Huang, E.S. (2003): Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus, *Nature* 424, pp. 456-461.
- Wang, X., Luo, H., Chen, H., Duguid, W., and Wu, J. (1998a): Role of proteasomes in T cell activation and proliferation, *J Immunol* 160, pp. 788-801.
- Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., and Pandolfi, P.P. (1998b): PML is essential for multiple apoptotic pathways, *Nat Genet* 20, pp. 266-272.
- Wathen, M.W., and Stinski, M.F. (1982): Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection, *J Virol* 41, pp. 462-477.
- Weiland, K.L., Oien, N.L., Homa, F., and Wathen, M.W. (1994): Functional analysis of human cytomegalovirus polymerase accessory protein, *Virus Res* 34, pp. 191-206.
- Welch, A.R., Woods, A.S., McNally, L.M., Cotter, R.J., and Gibson, W. (1991): A herpesvirus maturational protease, assemblin: identification of its gene, putative active site domain and cleavage site, *Proc Natl Acad Sci USA* 88, pp. 10792-10796.
- Whitby, F.G., Masters, E.I., Kramer, L., Knowlton, J.R., Yao, Y., Wang, C.C., and Hill, C.P. (2000): Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators, *Nature* 408, pp. 115-120.

- Wiebusch, L., and Hagemeier, C. (2001): The human cytomegalovirus immediate early 2 protein dissociates cellular DNA synthesis from cyclin-dependent kinase activation, *EMBO J* 20, pp. 1086-1098.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., and Ploegh, H.L. (1996): Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction, *Nature* 384, pp. 432-438.
- Winkler, M., Schmolke, S., Plachter, B., and Stamminger, T. (1995): The pUL69 protein of human cytomegalovirus (HCMV), a homologue of the herpes simplex virus ICP27, is contained within the tegument of virions and activates the major immediate-early enhancer of HCMV in synergy with the tegument protein pp71 (ppUL82), *Scand J Infect Dis Suppl* 99, pp. 8-9.
- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., and Luo, H. (2007): Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway is correlated with proteasome inhibitor suppression of coxsackievirus replication, *Biochem Biophys Res Comm* 358, pp. 903-907.
- Woodhall, D.L., Groves, I.J., Reeves, M.B., Wilkinson, G., and Sinclair, J.H. (2006): Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter, *J Biol Chem* 281, pp. 37652-37660.
- Wu, J. (2002): On the role of proteasomes in cell biology and proteasome inhibition as a new frontier in the development of immunosuppressants, *Am J Transplant* 2, pp. 904-912.
- Xu, Y., Ahn, J.H., Cheng, M., apRhys, C.S., Chiou, C.J., Zong, J., Matunis, M.J., and Hayward, G.S. (2001): Proteasome-independent disruption of PML oncogenic domains (PODs), but not covalent modification by SUMO-1, is required for human cytomegalovirus immediate-early protein IE1 to inhibit PML-mediated transcriptional repression, *J Virol* 75, pp. 10683-10695.
- Yamamoto, T., Suzuki, S., Radsak, K., and Hirai, K. (1998): The UL112/113 gene products of human cytomegalovirus which colocalize with viral DNA in infected cell nuclei are related to efficient viral DNA replication, *Virus Res* 56, pp. 107-114.
- Yurochko, A.D., Hwang, E.S., Rasmussen, L., Keay, S., Pereira, L., and Huang, E.S. (1997): The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappaB during infection, *J Virol* 71, pp. 5051-5059.
- Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E. (2003): O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome, *Cell* 115, pp. 715-725.
- Zhong, J., and Khanna, R. (2005): Vaccine strategies against human cytomegalovirus infection, *Expert Rev Anti Infect Ther* 5, pp. 449-459.
- Zhu, H., Cong, J.P., Mamtora, G., Gingeras, T., and Shenk, T. (1998): Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, pp. 14470-14475.
- Zimmermann, A., Trilling, M., Wagner, M., Wilborn, M., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U.H., and Hengel, H. (2005): A cytomegaloviral protein

reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses, J Exp Med 201, pp. 1543-1553.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua dest</i>	destilliertes Wasser
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BDMA	Benzyldimethylamin
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CC ₅₀	<i>cytotoxic concentration 50%</i>
CPE	zytopathischer Effekt
CT-L	<i>chymotrypsin-like</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBA	2-Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithio-D-Threitol
E	<i>early</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EM	Elektronenmikroskopie
EMEM	<i>Eagle's Essential Minimal Medium</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötales Kälberserum

gB	Glykoprotein B
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HCl	Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HDAC	Histondeacetylase
hDaxx	<i>human Death-associated protein 6</i>
HELF	Humane embryonale Lungenfibroblasten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
HHV-6	Humanes Herpesvirus-6
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV-1	Herpes-simplex-Virus-1
HTLV-1	<i>Human T-Cell Leukemia Virus-1</i>
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration 50%</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
IR	<i>internal repeat</i>
K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kd	<i>knockdown</i>
kDa	Kilodalton
L	<i>late</i>
mAb	monoklonaler Antikörper
MCMV	Murines Cytomegalievirus
MCP	<i>major capsid protein</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIEP	<i>Major Immediate Early Promotor</i>
MNA	1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureanhydrid
MOI	<i>multiplicity of infection</i>

MRC5	<i>Medical Research Council 5</i>
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ SO ₄	di-Natriumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NaHPO ₃	Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
ND10	<i>nuclear domain 10</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NIEP	<i>non-infectious enveloped particle</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PFU	<i>plaque forming units</i>
PGPH	<i>peptidylglutamyl-peptide-hydrolysing</i>
PI	Proteasominhibitor(en)
PML	<i>promyelotic leukemia protein</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPE	Retinale Pigmentepithelzellen
RT-PCR	<i>real time PCR</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SUMO-1	<i>small ubiquitin-like modifier-1</i>
TCID ₅₀	<i>tissue culture infective dose 50%</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T-L	<i>trypsin-like</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>

TR	<i>terminal repeat</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UL	<i>unique long</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
US	<i>unique short</i>
UV	ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
VZV	Varizella-Zoster-Virus
w/v	Gewicht/Volumen
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5- ((phenylamino)carbonyl)-Tetrazoliumhydroxid

Anhang

Veröffentlichungen

PUBLIKATIONEN

- Prösch, S., and Kaspari, M. Proteasome inhibitors as complementary or alternative antiviral therapeutics. In New Concepts of Antiviral Therapy (E. Bogner and A. Holzenburg, eds.), Springer 2006, pp455-478.
- Kaspari, M., Zimmermann, A., Schilf, R., and Bogner, E. (2008) Proteasome inhibitor MG132 blocks viral DNA replication and assembly of human cytomegalovirus. FEBS Lett, 582:666-672.
- Kaspari, M., and Bogner, E. Antiviral activity of proteasome inhibitors / cytomegalovirus. In Proteases in Biology and Disease. Viral Proteases and Antiviral Protease Inhibitor Therapy. (N. Hooper and U. Lendeckel, eds.), Springer 2009, pp79-92.

VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN

- Kaspari, M., and Prösch, S. (2004). Inhibition of human cytomegalovirus replication by proteasome inhibitors. Vortrag bei der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover, Deutschland.
- Kaspari, M., and Prösch, S. (2005). The ubiquitin-proteasome pathway is involved in regulation of HCMV IE2 expression. Posterpräsentation beim 30th International Herpesvirus Workshop, Turku, Finnland.
- Kaspari, M., and Prösch, S. (2005). Inhibition of human cytomegalovirus replication by proteasome inhibitors. Vortrag bei der 16th European Students' Conference, Berlin, Deutschland.
- Kaspari, M., Krüger, D.H., Stamminger, T., and Prösch, S. (2006). Inhibition of human cytomegalovirus replication by proteasome inhibitors. Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, Deutschland.
- Kaspari, M., and Bogner, E. (2007). HCMV replication requires proteasome activity. Vortrag beim 11th International CMV and Betaherpesvirus Workshop, Toulouse, Frankreich.
- Kaspari, M., Schilf, R., and Bogner, E. (2007). HCMV replication requires proteasome activity. Posterpräsentation beim 3rd European Congress of Virology, Nürnberg, Deutschland.
- Kaspari, M., and Bogner, E. (2008). Human cytomegalovirus replication essentially depends on 20S proteasome activity. Posterpräsentation beim 33rd International Herpesvirus Workshop, Estoril, Portugal.

Berlin, den 18.02.2009

Marion Kaspari

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Doktorarbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Berlin, den 18.02.2009

Marion Kaspari

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Detlev H. Krüger möchte ich für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Virologie der Charité zu promovieren und für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Biologie danken.

Meiner 2005 überraschend verstorbenen Arbeitsgruppenleiterin Frau Prof. Dr. Susanna Prösch danke ich für die Bereitstellung des vielseitigen und interessanten Themas sowie für die Unterstützung bei der Planung und Ausführung der experimentellen Arbeiten.

Mein Dank gilt weiterhin meiner jetzigen Arbeitsgruppenleiterin Frau PD Dr. Elke Bogner für die engagierte Unterstützung bei der Weiterführung der experimentellen Arbeiten und dem Abschluss der Promotion.

Ich danke der Sonnenfeld-Stiftung Berlin und insbesondere dem Vorstandsvorsitzenden Herrn Prof. Dr.-Ing. Dr. med. h.c. Hansjürgen Frhr. von Villiez für die sehr persönliche und motivierende Begleitung der Promotion.

Rita Schilf, Angelika Lander, Alexandra Dittmer, Corina Thoma, Jae-Seon Hwang und Christina Meissner möchte ich für die gute Zusammenarbeit, die nette und kollegiale Arbeitsatmosphäre, die große Hilfsbereitschaft sowie die anregenden Diskussionen danken.

Dagmar Siele danke ich dafür, dass sie mir stets ihre Kenntnisse auf dem Gebiet der Proteasomforschung zur Verfügung gestellt hat.

Bei Ulrike Liebs möchte ich mich für das kritische Lesen der Dissertation bedanken.

Mein persönlichster Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meinem geliebten Oli für ihre liebevolle und rückhaltlose Unterstützung.